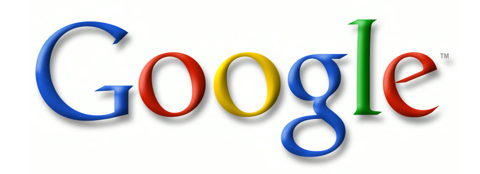
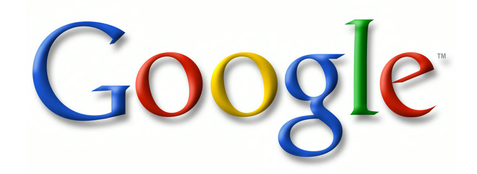
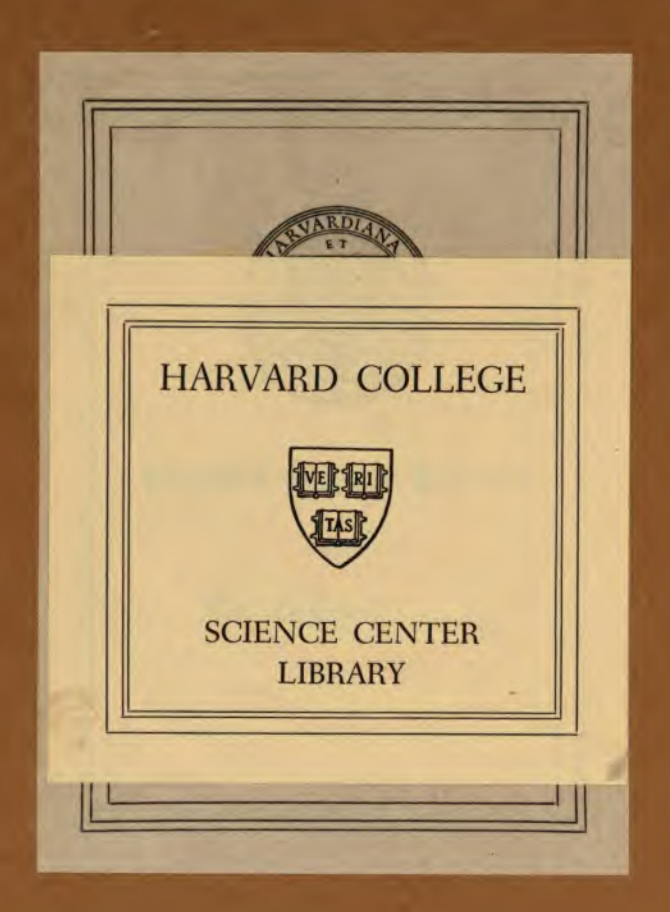





Chem
7889
06
1906
Untersuchungen an drei
Regensburger · Obergärigen arten von Bierhefe


HARVARDIANA
ET
HARVARD COLLEGE
VE RI
TAS
SCIENCE CENTER
LIBRARY

Vergleichende Untersuchungen

an

drei obergärigen Arten von Bierhefe.

Von der

K. Technischen Hochschule zu München

zur

Erlangung der Würde eines

Doktors der technischen Wissenschaften

(Doktor-Ingenieurs)

genehmigte Dissertation.

Vorgelegt von

Paul Regensburger

aus Fürth i. B.

Referent:
Prof. Dr. C. O. Harz.

Korreferent:
Prof. Dr. C. Lintner.

Jena,

Gustav Fischer.

1906.

Vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1904/1905 in der gärungsphysiologischen Abteilung des Laboratoriums der K. Versuchsbrauerei Weihenstephan ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinen vorgesetzten Behörden, der Direktion der K. Akademie für Landwirtschaft und Brauerei und dem Vorstande der K. Versuchsbrauerei Weihenstephan meinen besten Dank für ihr wohlwollendes Entgegenkommen auszusprechen, ebenso den Herren Proff. Dr. C. O. Harz und Dr. L. Lintner für das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht haben, und für die gütige Uebernahme des Referates bezw. Korreferates.

Mit besonderem Danke sei aber auch an dieser Stelle meines hochverehrten Lehrers, Herrn Prof. Dr. H. Will, gedacht, der mich nicht nur zur Bearbeitung des vorliegenden Themas anregte, sondern mir auch bei der Abfassung mit Rat und Tat in liebenswürdigster Weise zur Seite stand.

I. Einleitung.

Die hervorragende Bedeutung, welche den Saccharomyceten auf großen industriellen Gebieten wie dem der Bierbrauerei, Brennerei und Weinbereitung zukommt, gab wohl in besonderem Maße Veranlassung, daß seit dem Erwachen der naturwissenschaftlichen Forschung sowohl Chemiker wie Botaniker die Hefe und ihre Lebenstätigkeit mit einer gewissen Vorliebe zum Gegenstand ihrer Studien machten. Doch können erst die Jahre 1836/37 als die eigentlichen Geburtsjahre der Gärungschemie und Gärungsphysiologie betrachtet werden[1]; es sind dies diejenigen Jahre, in denen Th. Schwann[2]), Ch. Cagniard-Latour[3]) und Fr. Kützing[4]) die Hefe als pflanzlichen Organismus und als Ursache der Alkoholgärung erkannten. Fast gleichzeitig entbrannte auch der Streit um die physikalisch-chemische und um die vitalistische Theorie der Gärung, als deren hauptsächlichste Vertreter einerseits J. von Liebig[5]) und andererseits L. Pasteur[6]) zu nennen sind. Jahrzehntelang schien es, als ob die vitalistische Theorie Pasteurs Siegerin in diesem Kampfe bleiben werde, erst in neuerer Zeit erfuhr sie insofern eine Einschränkung, als durch die Arbeiten E. Fischers[7]), besonders aber durch die grundlegenden Untersuchungen von E. Buchner[8]) nachgewiesen wurde, daß nicht die Lebenstätigkeit der Hefe an sich, sondern ein von derselben erzeugter enzymartiger Körper die Spaltung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure herbeiführt.

Während der chemische Teil unserer Kenntnis von den Saccharomyceten und ihrer Lebenstätigkeit schon verhältnismäßig frühzeitig auf eine hohe Stufe gebracht worden war und während heute noch in zahl-

1) Delbrück, M., Ueber die Fortschritte der Gärungschemie in den letzten Dezennien. (Wochenschrift f. Brauerei, Bd. XXXIX. 1898. p. 498.)

2) Schwann, Th., Vorläufige Mitteilung betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis.

3) Cagniard-Latour, Ch., Abhandlung über die weinige Gärung.

4) Kützing, Fr., Mikroskopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. (Letztere 3 Abhandlungen aus dem Werke: M. Delbrück und A. Schrohe, Hefe, Gärung und Fäulnis. Berlin 1904. p. 3 u. ff., p. 12 u. ff. und p. 25 u. ff.)

5) von Liebig, J., Die organ. Chemie in ihrer Anwendung auf Agrikultur und und Physiologie. Braunschweig 1840. 1. Auflage, 2. Teil.

6) Pasteur, L., Etudes sur la bière. Paris 1876. p. 150 u. ff.

7) Fischer, E., Die Chemie der Kohlehydrate und ihre Bedeutung für die Physiologie. Berlin 1894. p. 23—32.

8) Buchner, E., Fortschritte in der Chemie der Gärung. Tübingen 1897.

reichen gärungsphysiologischen Laboratorien mit Erfolg an der Erweiterung derselben gearbeitet wird, ist die botanische Seite lange vernachlässigt worden. Selbst Pasteur, der Begründer des modernen Experimentalstudiums der Mikroorganismen, betrachtet alle Sproßpilze, welche die Fähigkeit der Alkoholbildung besitzen, kurzweg noch als Saccharomyceten, wie denn überhaupt seine Ansichten über die botanische Stellung der Gärungsorganismen teilweise unsicher und schwankend waren. Zwar hatte schon Th. Schwann[1]) 1839 die Bildung von Endosporen in Hefezellen beobachtet und J. de Seynes[2]) 1868 diese Erscheinung deutlicher beschrieben. Aber erst im Jahre 1870 wurde die Eigenschaft der Endosporenbildung von M. Reess[3]) als Charakteristikum dieser Sproßpilze erkannt, die Gattung Saccharomyces genauer definiert und die Selbständigkeit der zu ihr gehörenden Arten begründet. Damit war jedenfalls ein großer Fortschritt gewonnen, indem die Hefen im engeren Sinn von anderen hefeähnlichen, durch Sprossung sich vermehrenden Pilzen getrennt wurden. Nun war ja die Zugehörigkeit einzelner dieser Formen zu höheren Pilzen schon früher bekannt und ihre Zahl ist in neuerer Zeit beträchtlich vermehrt worden[4]). Es kann also nicht wunder nehmen, daß auch damals die bis jetzt noch nicht ganz verschwundene Anschauung weite Verbreitung gefunden hatte, daß auch die Saccharomyceten nur einen eigentümlichen Entwickelungszustand höherer Pilze darstellen. Dieser Anschauung trat Reess[5]) mit Entschiedenheit in seinen „botanischen Untersuchungen“ entgegen, nachdem schon früher A de Bary[6]) dieselbe einer scharfen Kritik unterzogen hatte. Reess[7]) kann auch das Verdienst für sich in Anspruch nehmen, der Gattung Saccharomyes ihren Platz im System der Pilze angewiesen zu haben, indem er sie als niedere Askomyceten auffaßte und in der Nähe der Gattung Exoascus einreihte. Dieser Auffassung der systematischen Stellung der Saccharomyceten ist auch noch die heutige Wissenschaft im großen und ganzen treu geblieben. Dagegen ist sein Versuch, eine Systematik der Saccharomyceten selbst aufzustellen, wie wir heute wissen, ein verfehlter gewesen. Der Grund hierzu ist vor allem im Mangel von Reinkulturen und in der Unvollkommenheit der damaligen Untersuchungsmethoden zu suchen. Es fehlte eben noch die Grundlage für jedes experimentelle Forschen auf diesem Gebiet, eine absolut zuverlässige Methode der Reinkultur. Die von Reess aufgestellten Arten waren lediglich auf Größe und Form der Zellen, Größe der Sporen und auf die Art der Sprossung basiert; und wenn auch heute noch die von ihm eingeführten Bezeichnungen wie Saccharomyces pastorianus, ellipsoideus, exiguus u. s. w. im Gebrauch sind, so ist doch längst erwiesen, daß die einzelnen Hefearten nicht durch die Zellform allein charakterisiert werden können, da die verschiedensten

---

1) Schwann, Th., Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen. Berlin 1839.

2) de Seynes, J., Sur le mycoderma vini. Comptes rendus de l'Acad. sc. XLVII. 1868. p. 105.

3) Reess, M., Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870. p. 75.

4) Brefeld, O., Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Bd. VII. 1883 und Ueber Schimmelpilze, Heft V.

5) Rees, M., Botanische Untersuchungen etc. p. 44—69.

6) de Bary, A., Morphologie der Pilze. Frankfurt 1866. p. 181. — Ueber Schimmel und Hefe. Berlin 1869.

7) Reess, M., Botanische Untersuchungen etc. p. 77.

Zellformen je nach der Temperatur, der Zusammensetzung der Nährlösung und des Alters der Kultur bei ein und derselben Hefeart auftreten können. Allerdings muß zugegeben werden, daß bei einem Vergleich von Reinkulturen einzelne Zellformen unter gleichen Versuchsbedingungen bei verschiedenen Arten vorherrschend sind und so ein gutes Artenmerkmal bilden können. Auch die Bedingungen für den Eintritt der Askosporenbildung waren Reess zum größten Teil noch unbekannt. Trotzdem machten sich die von ihm ausgesprochenen Anschauungen lange geltend und sind zum Teil auch heute noch in manchen botanischen Werken vertreten.

Die Anschauungen von Reess über die Selbständigkeit der Saccharomyceten und ihrer Stellung im System der Pilze fanden scharfen Widerspruch, insbesondere von O. Brefeld. An verschiedenen Stellen seiner „Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie [1]) sucht er die Zugehörigkeit der Saccharomyceten zu höheren Pilzen zu beweisen. L. Cienkowski[2]), der allerdings mit sehr unvollkommenen Untersuchungsmethoden arbeitete, gab der Anschauung Ausdruck, daß die Saccharomyceten nur Entwickelungsstadien von Mycoderma vini seien. Auch C. O. Harz[3]) und C. von Naegeli[4]) beschäftigten sich mit der Frage der Stellung der Saccharomyceten im System der Pilze; letzterer ging sogar so weit, den Hefen jede Konstanz der Arten in morphologischer und physiologischer Beziehung abzusprechen und die Ansicht zu vertreten, daß sie sich leicht in andere Formen überführen lassen.

Einen Wendepunkt in der Hefeforschung brachten die grundlegenden Arbeiten von Emil Chr. Hansen in Kopenhagen. Seine hervorragenden Verdienste um die Praxis der Gärungsindustrien zu besprechen ist hier nicht am Platze, sein wissenschaftliches Verdienst ist dadurch bestimmt, daß er auf experimenteller Grundlage eine klare Definition der Gattung Saccharomyces schuf. Hierzu bedurfte es aber in erster Linie einer Methode zur Herstellung absoluter, von einer Zelle ausgehenden Reinkulturen[5]). Ferner legte er durch seine umfangreichen Arbeiten über die Bildung der Endosporen[6]), über die Hautbildung[7]), über Variation bei den Saccharomyceten[8]) und anderen mit Sicherheit dar, daß die Saccharomyceten in wohlcharakterisierte Arten, Rassen und Varietäten zerfallen.

Gewissermaßen den Schlußstein des umfangreichen Baues, den die Arbeiten Hansens darstellen, bilden seine „Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten“, welche er im Jahre 1904 veröffentlichte[9]). Dank

---

1) Brefeld, O., Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. 1891. Heft 9. p. 146—149. — Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. 1883. Heft 5. p. 178—202.

2) Cienkowski, L., Die Pilze der Kahmhaut. (Bulletins der Petersburger Akademie. T. VIII. 1872. p. 566.)

3) Harz, C. O., Untersuchungen über die Alkohol- und Milchsäuregärung. Wien 1871.

4) Naegeli, C. v., Theorie der Gärung. München 1879. p. 120.

5) Hansen, E. Chr., Methoden für die Reinkultur von Saccharomyces und ähnliche Mikroorganismen. (Compt. rend. des travaux du laborat. de Carlsberg. Bd. II. Heft 4. 1886. p. 92 u. ff.)

6) Hansen, E. Chr., Die Askosporen bei der Gattung Saccharomyces. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1883. p. 310.)

7) Hansen, E. Chr., Die Kahmhäute der Gattung Saccharomyces. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1886. p. 374.)

8) Hansen, E. Chr., Die Variation bei den Saccharomyceten. (Ibid. 1890. p. 145.)

9) Hansen, E. Chr., Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten. (Centralblatt für Bakt. u. Paras. Abt. II. 1904. No. 19—21.)

der zahlreichen Einzelarbeiten Hansens, seiner Schüler und Nachfolger ist nun an Stelle der von Reess angenommenen einen Gattung mit 7 Arten die Familie der Saccharomyceten mit 8 Gattungen und über 100 Arten getreten.

„Grundlinien" bezeichnet Hansen sein System und sagt damit selbst, daß die Systematik der einzelnen Gattungen der Familie Saccharomyces und die Festlegung der Arten noch weiterer Forschung bedürfe; er selbst stellt eine diesbezügliche ausführlichere Abhandlung in Aussicht. Von all diesen zahlreichen Arten sind infolge ihrer industriellen Bedeutung wohl diejenigen Hefearten am meisten Gegenstand eifrigen Studiums geworden, die man bisher unter der althergebrachten Bezeichnung „Kulturhefen" zusammenfaßt. In der zymotechnischen Literatur ist eine große Anzahl der verschiedensten Typen oder Rassen von Hefen beschrieben. welche in der Technik der Bier-, Wein- und Obstweinbereitung, in der Brennerei u. s. w. eine Rolle spielen, die meisten jedoch nicht so vollkommen, wie dies von dem jetzt gewonnenen Standpunkt aus gefordert werden muß. Speziell gilt dies für die untergärigen Bierhefen.

Hansen hat einige diesbezügliche Abhandlungen [1]) veröffentlicht, die geradezu vorbildlich für die weitere Behandlung der Frage geworden sind. Die eingehendsten Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte der untergärigen Bierhefen stammen indessen von Will [2]). Seine Arbeiten sind es besonders, welche, abgesehen von der durch morphologische und entwickelungsgeschichtliche Untersuchungen noch fester begründeten Tatsache der Existenz verschiedener Arten von untergäriger Bierhefe, einen Einblick in das Wesen der Hautbildung bei den Saccharomyceten gestatten und die Gleichwertigkeit der Hautbildungen auf flüssigem Nährsubstrat mit den sogenannten Riesenkolonieen auf festem Nährboden nachweisen sowie die wechselnden Formerscheinungen der letzteren zu erklären versuchen.

Während so die Morphologie und Biologie der untergärigen Arten und Rassen von Bierhefe von verschiedenen Seiten eingehend studiert wurde, ist das Studium der obergärigen Bierhefen in dieser Beziehung ziemlich vernachlässigt worden, obgleich der technischen Seite der Herstellung obergäriger Biere namentlich von der Berliner Schule während der letzten Jahre erhöhte Aufmerksamkeit zugewendet wurde. Rein botanische Arbeiten über Oberhefen liegen fast gar nicht vor, die meisten Forscher legten auch hier das Schwergewicht ihrer Studien auf die Erforschung der physiologischen Wirksamkeit der Oberhefen, speziell ihres Verhaltens gegenüber den Kohlehydraten, sowie auf die technische Seite der Frage. Und doch liegt die Wahrscheinlichkeit sehr nahe, daß auch bei den obergärigen Bierhefen ebenso wie bei den untergärigen verschiedene Arten und Rassen auftreten, die sich nicht allein durch ihr physiologisches Verhalten unter sich und von den untergärigen Kulturhefen unterscheiden, sondern auch als ein durch morphologische und entwickelungsgeschichtliche Merkmale Zusammengehöriges betrachtet und den untergärigen Bierhefen gegenüber gestellt werden müssen. Von diesem Gesichtspunkte aus veranlaßte mich Herr Prof. Dr. Hermann Will, München, an der Hand seiner Arbeiten und im steten Vergleich mit den von ihm untersuchten vier untergärigen Bierhefen vergleichende

1) Hansen, E. Chr., Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie I. München 1895.

2) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895, 1898, 1899, 1902, 1904 und 1905.)

Untersuchungen an einigen Reinkulturen darüber anzustellen, welche Unterschiede im Aufbau und der Gestalt der Zellen bei gleichen äußeren Verhältnissen, bei der Bildung von Endosporen und im Verhalten der obergärigen Hefen bei der Kultur auf festem Nährboden, sowohl bei der Einzell-Kultur als auch bei den Riesenkolonieen, auftreten und wie weit diese mit den von ihm an den untergärigen Arten von Bierhefe beobachteten übereinstimmen. Als Material für meine Untersuchungen wurden mir in liebenswürdiger Weise aus der Sammlung der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München drei obergärige Bierhefen in Reinkultur zur Verfügung gestellt. Oberhefe No. 25 entstammt einer Kelheimer Weizenbierbrauerei, Oberhefe Rio einer obergärigen Brauerei in Rio de Janeiro und Oberhefe No. 170 einer französischen Brauerei. Im folgenden seien sie der Kürze halber nur mit ihrer Nummer bezw. ihrem Namen bezeichnet. Meine Untersuchungen erstreckten sich also in erster Linie auf die morphologischen Unterschiede bei den Zellen der gewöhnlichen Alkoholgärungsform, dann auf die Bildung der Sporen und die Entwickelung der Kahmhäute in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur und auf das Auftreten der von Will bei den untergärigen Hefen konstatierten verschiedenen Generationen von Kahmhautzellen. Ferner wurden noch sowohl die Wachstumsformen der drei Hefen auf festem Nährboden in Einzell-Kolonieen als auch die Entwickelung und der anatomische Bau der sogenannten Riesenkolonieen beobachtet. Am Schlusse meiner Ausführungen sind noch einige Versuche über die Differenzierung der drei Hefen durch ihr physiologisch-chemisches Verhalten gegenüber den Zuckerarten angegeben.

Bevor ich zum speziellen Teil dieser Ausführungen übergehe, möchte noch kurz die Frage berührt werden, ob die Erscheinung der Ober- bezw. Untergärung beständige Eigenschaften zweier verschiedener Gruppen der Gattung Saccharomyces cerevisiae sind oder ob diese wechseln können. Bekanntlich unterscheiden sich obergärige und untergärige Hefen in der Praxis und auch bei größeren Laboratoriumsversuchen dadurch, daß die obergärigen Hefen bei den in der Technik üblichen Temperaturen von 15—20° während der Hauptgärung weniger Neigung zeigen, einen festen Bodensatz zu bilden, besonders am Anfang der Gärung, sondern sich in der die Oberfläche der gärenden Flüssigkeit bedeckenden Schaumdecke in großer Menge ansammeln, bei der Untergärung ist eine solche Hefeschicht meistens überhaupt nicht vorhanden oder höchstens in sehr geringer Ausdehnung. Begründet ist diese Erscheinung hauptsächlich dadurch, daß bei den obergärigen Hefen die aus der Mutterzelle in aufeinanderfolgenden Generationen erzeugten Tochterzellen in größeren Sproßverbänden vereinigt bleiben und damit den Auftrieb durch die Kohlensäure erleichtern. Bei der Untergärung kommt es dagegen nur selten zu größeren Sproßverbänden, da die Tochtergenerationen sich sehr bald voneinander ablösen. Früher war die Ansicht allgemein verbreitet, daß Oberhefe und Unterhefe nur Varietäten von Saccharomyces cerevisiae seien und leicht ineinander übergeführt werden können. Dies war z. B. noch die Anschauung, welche Rees[1]) vertrat; Pasteur[2]) neigt im allgemeinen zu der gleichen Ansicht, obwohl er bisweilen durch seine Versuche zu dem entgegengesetzten Resultat gelangt[3]). Hansen[4])

1) Rees, M., Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. p. 8.
2) Pasteur, L., Études sur la bière. Paris 1876 p. 213 und Anmerkung. p. 333.
3) Pasteur, L., ibid. p. 189.
4) Hansen, E. Ch., Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie I. p. 69.

zeigte jedoch durch lange planmäßig fortgesetzte Versuche, daß obergärige und untergärige Hefen zwei verschiedene Gruppen bilden. Er züchtete zahlreiche Generationen von Unterhefe bei den Temperaturen der Obergärung, ohne jemals wirkliche Obergärungserscheinungen beobachten zu können. Andererseits konnte Oberhefe durch fortgesetzte Züchtung bei der niederen Temperatur der Untergärung (5—7°) nicht dazu gebracht werden, die Erscheinungen der Obergärung aufzugeben; sobald sie bei höherer Temperatur weitergezüchtet wurde, trat wieder lebhafte Obergärung ein. Durch diese während ca. 11 Jahren durchgeführten Versuche hatte sich die Anschauung gefestigt, daß die Erscheinung der Obergärung eine unveränderliche Eigenschaft gewisser Hefearten ist, welche dadurch scharf von den untergärigen Hefearten geschieden werden. Allerdings waren durch Will, Henneberg u. a.[1]) bei Verwendung von Reinkulturen von untergäriger Bierhefe in der Praxis und im Laboratorium Erscheinungen beobachtet worden, welche dafür sprachen, daß eine Umwandlung von untergäriger in obergärige Hefe sich vollziehen könne. In einzelnen Fällen ließen sich diese Hefen durch geeignete Behandlung wieder dazu bringen, Untergärungserscheinungen zu zeigen, in anderen Fällen jedoch nicht. Ob alle diese Erscheinungen gleicher Art sind, ob nicht vielmehr neben wirklichen Obergärungserscheinungen, welche in der Hefe begründet sind, nicht auch, hervorgerufen durch eine besondere Beschaffenheit der Nährlösung, nur der Obergärung ähnliche Erscheinungen vorliegen, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden. (Nach den neuesten Untersuchungen von Hansen[2]) scheint jedoch tatsächlich eine Umwandlung von Unterhefeformen in Oberhefeformen bei dünner Schicht der Nährlösung und bei niedriger Temperatur stattzufinden. Inwieweit diese nach der von Hansen angegebenen Methode aus Unterhefe gezüchteten Oberhefen im übrigen die in vorliegender Arbeit aufgeführten charakteristischen Eigenschaften von Arten zeigen, welche, wie beispielsweise No. 25, seit einer sehr langen Reihe von Jahren in der Praxis der obergärigen Brauerei angewendet wurden, müßten erst noch weitere Untersuchungen ergeben. Insbesondere wäre es interessant zu erfahren, ob auch die aus Unterhefen erzeugten Oberhefen sich durch „sparrigen“, ganz unregelmäßigen Wachstumstypus in Einzell-Kolonieen und durch ihr Unvermögen, Melibiose zu vergären, auszeichnen.)

Durch die Untersuchungen von A. Bau[3]) über das Verhalten der obergärigen Hefen gegenüber Raffinose und von E. Fischer[4]) über das Fehlen der Melibiase bei denselben ist auf physiologischem Gebiet ein Charakterunterschied zwischen Oberhefe und Unterhefe aufgestellt worden, der auch durch das später konstatierte Vorkommen von Ausnahmen[5]) nicht an Wert verloren hat. Von Bau[6]) ist das Verhalten

---

1) Will, H., Erfahrungen mit Reinhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1897. p. 591 ff.) — Henneberg, W., Variation einer untergärigen Hefe während der Kultur. (Wochenschrift für Brauerei. 1900. p. 633.)

2) Hansen, E. Chr., Studien über Variation und Erblichkeit von Ober- und Unterhefe. (Centralblatt für Bakt. und Paras. Abt. II. 1905. No. 12. p. 353.)

3) Bau, A., Ueber das Verhalten von Oberhefe gegenüber Isomaltose und Raffinose. (Wochenschrift für Brauerei. 1894. p. 113.)

4) Fischer, E. und Lindner, P., Ueber die Enzyme einiger Hefen. (Wochenschrift für Brauerei. 1895. No. 40.)

5) Lindner, P., Gärversuche mit verschiedenen Hefe- und Zuckerarten. (Wochenschrift für Brauerei. 1900. p. 49—51.)

6) Bau, A., Der Sammelbegriff Saccharomyces cerevisiae. (Wochenschrift für Brauerei. 1894. p. 43.)

von Oberhefe gegenüber Raffinose dazu benutzt worden, ein System des Sammelbegriffes „Saccharomyces cerevisiae" vom chemischen Standpunkt aus aufzustellen. Wohl sind derartige physiologische Hilfsmittel sehr schätzenswert für die Diagnostizierung der einzelnen Hefearten. Aber zur Aufstellung eines natürlichen Systems sind sie durchaus nicht ausreichend, denn dieses soll ja die natürliche Verwandtschaft der einzelnen Rassen oder Arten zum Ausdruck bringen und dazu ist vor allem die möglichst gründliche Erforschung einer großen Anzahl von Kulturhefen nach morphologischen und entwickelungsgeschichtlichen Gesichtspunkten nötig. Erst dann wird die Aufstellung eines Systems der Gattung Saccharomyces cerevisiae möglich sein.

Zur Erreichung dieses Zieles einiges beizutragen, sei der Zweck der folgenden Ausführungen.

II. Morphologie der Zellen aus normalen Würzegärungen.

Wenn auch die Form der Hefezellen durch mannigfache Einflüsse äußerer Art wie Temperatur, Konzentration und chemische Zusammensetzung der Nährlösung, je nach dem Stadium, in welchem sich die Kultur befindet, variiert, so darf doch als feststehend angenommen werden, daß bei unter gleichen äußeren Bedingungen durch zahlreiche Generationen fortgesetzter Kultur die Form und das physiologische Verhalten der Hefezellen wenigstens nicht in auffälliger Weise verändert wird. Außerdem ist durch das Studium von Reinkulturen bekannt, daß bei manchen Arten spezifische Zellformen auftreten oder daß bestimmte, allerdings auch bei anderen Arten vorkommende Zellformen vorherrschend sind. Die Form der Zellen, welche bei einer Hefe unter bestimmten, gleichen Verhältnissen auftritt, kann also sehr wohl ein diagnostisches Merkmal, wenn auch zweiten Ranges, abgeben; jedenfalls hat es ein gewisses Interesse, auch dieser Frage experimentell näherzutreten. Hierbei bot sich auch gleichzeitig Gelegenheit, den Einfluß der Temperatur sowie denjenigen der Konzentration der in den gärungsphysiologischen Laboratorien am häufigsten als Nährflüssigkeit verwendeten Bierwürze und endlich die Erscheinungen, welche infolge der Lebenstätigkeit der Hefe äußerlich sowohl wie in den Zellen auftreten, näher kennen zu lernen.

Zunächst wurden die drei Versuchshefen von der Würzegelatine in gewöhnliche Bierwürze (12 Proz. Ball.) gebracht und dann mehrere Male bei Zimmertemperatur in frische Würze weitergeimpft. Das Abimpfen erfolgte jedesmal während der lebhaftesten Gärung, wobei man annehmen konnte, daß sich die überwiegende Mehrzahl der Zellen in gutem Lebenszustand befinde. Nachdem so eine ca. 12-malige Ueberimpfung von Würze in Würze stattgefunden hatte, wurden je zwei Kulturen von jeder Oberhefe mit annähernd gleicher Aussaatmenge bei 10°, 20° und 30° aufgestellt. Als Nährflüssigkeit diente sowohl gewöhnliche Braunbierwürze als auch Weizenbierwürze, wie sie die bayerischen „Weißbierbrauereien" erzeugen, und zwar wurde je ein Versuch mit einer konzentrierten Würze (17 Proz. Ball.) und einer schwächeren Würze (10 Proz. Ball.) durchgeführt. Die Entnahme der Hefeproben zur mikroskopischen Untersuchung erfolgte sowohl zur Zeit des Höhepunktes als auch gegen das Ende der Hauptgärung, wenn die Kohlensäureentwickelung fast aufgehört hatte.

Ueber die Zellformen, welche in diesen Kulturen beobachtet wurden, sei folgendes mitgeteilt:

Hefe Rio bietet im Gegensatz zu den beiden anderen Hefen das typische Bild einer Kulturhefe. Die Zellform ist überwiegend elliptisch, doch kommen auch runde Formen vor. Der Längsdurchmesser der ovalen Zellen schwankt zwischen 9 und 11 μ, der Breitendurchmesser zwischen 7 und 9 μ. Oberhefe Rio scheint große Neigung zur Bildung gestreckter Formen zu besitzen, namentlich bei höherer Temperatur (30 °) treten nicht selten wurstförmige Zellen von 14—15 μ Länge und 5—6 μ Breite auf. Auf diese Eigenschaft der Hefe Rio soll auch noch später zurückgekommen werden. Der Inhalt der Zellen war, besonders in jungen Kulturen, sehr homogen, das Lichtbrechungsvermögen des Plasmas nicht so stark, daß man die Vakuolen deutlich vom übrigen Zellinhalt hätte unterscheiden können. Erst bei Behandlung mit Jod traten die Vakuolen deutlicher hervor, oft 2, seltener 3 oder eine in einer Zelle. Hansen[1]) konnte bei der Unterhefe Karlsberg No. 2 eine ähnliche Erscheinung beobachten. Im Plasma konnten hie und da einige stark lichtbrechende Körperchen (Granula) beobachtet werden, nie dagegen in den Vakuolen.

Oberhefe 25 besitzt meist rundliche Zellformen, der Längsdurchmesser ist 7—9 μ, der Breitendurchmesser 7—8 μ. Vereinzelt treten große Zellen (14—15 μ Durchmesser) von runder Form auf. Gegenüber dem ziemlich homogenen Plasma der gewöhnlichen Zellen erschien dasselbe in den großen Zellen stark granuliert. Am Ende der Gärung zeigten diese großen Zellen, die sogenannten Riesenzellen, meist Neigung zum Absterben und zu raschem Zerfall. Will[2]) konnte bei der von ihm beobachteten untergärigen Hefe 7 die gleiche Erscheinung konstatieren. Diese Riesenzellen werden von W. Henneberg[3]) als pathologische Formen der Hefe aufgefaßt. Die Vakuolisierung der Oberhefe 25 ist eine reichliche, charakteristisch ist hierbei das Auftreten von stark lichtbrechenden, in lebhafter Bewegung (Brownsche Molekularbewegung) befindlichen Körnchen (Granula), meist ein größeres, selten 2—3 kleinere, in den Vakuolen. Sind mehrere Vakuolen in einer Zelle vorhanden, so wird gewöhnlich in jeder derselben ein derartiges Körnchen beobachtet. Ueber die Natur und Beschaffenheit derselben soll später berichtet werden[4]).

Die Zellen der Oberhefe 170 zeigen im allgemeinen kein so gleichartiges Gepräge wie die der Hefen Rio und 25, es treten vielmehr runde, ovale und ovoide Formen auf. Auch die Zellgröße variiert im Gegensatz zu den beiden anderen Hefen ziemlich stark, doch ist die Mehrzahl der Zellen etwas kleiner als bei Hefe Rio und 25. Der Längsdurchmesser betrug ca. 7,5—9 μ, der Breitendurchmesser 7—8 μ. Verhältnismäßig sehr zahlreich treten Riesenzellen auf, welche oft runde, nicht selten aber auch ovale oder „birnförmige" Gestalt haben. Diese Birnenform ist übrigens auch bei normalen Zellen der Hefe 170 ziemlich häufig. Das Plasma ist bei Oberhefe 170 sehr zur frühzeitigen Vakuolisierung geneigt; oft findet man bei älteren Zellen das Plasma nur in Fäden und Strängen in dem fast ganz von Vakuolen eingenommenen

---

1) Hansen, E. Chr., (Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie I. München. 1895. p. 74.)

2) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 3.)

3) Henneberg, W., Lebensdauer einiger Kulturheferassen in feuchtem Zustand und Einfluß verschiedener Organismen auf diese Hefen. (Wochenschrift für Brauerei. 1904. p. 311.)

4) Siehe p. 12.

Zellraum verteilt[1]). Granula in den Vakuolen konnten nicht beobachtet werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung junger Würzekulturen konnte also Stamm Rio und Stamm 25 durch die ziemlich gleichmäßige Zellform, Stamm 25 speziell durch das fast gleichmäßige Auftreten von Granula in den Vakuolen erkannt werden. Stamm 170 ist durch das häufige Vorkommen von Riesenzellen, durch zahlreiche „birnförmige" Zellen und durch das relativ frühe Eintreten der Vakuolisierung charakterisiert. Irgendwelche schärfer hervortretende Merkmale, welche die obergärigen Hefen schon nach der Zellform von den untergärigen Arten, speziell den von Will beschriebenen 4 Stämmen unterschieden hätten, konnten also nicht konstatiert werden.

Die Temperaturen, bei denen die Kulturen der drei obergärigen Hefen gezogen wurden, hatten im allgemeinen auf die Form der Zellen keinen Einfluß, lediglich Hefe Rio zeigte, wie schon erwähnt, bei höheren Temperaturen Neigung zur Bildung gestreckter, mehr oder weniger wurstförmiger Zellen.

Veränderungen der Zellformen und ihrer Größenverhältnisse infolge höherer Konzentration der Würze oder der verschiedenen chemischen Zusammensetzung derselben konnten bei den vorliegenden drei Hefen nicht beobachtet werden. Die angewandten Nährlösungen, 10-proz. und 17-proz. Gerstenmalz- bezw. Weizenmalzwürze, zeigten in dieser Beziehung wohl zu geringe Differenzen. Auch eine Beeinflussung des Baues der Zellen durch diese Faktoren war nicht zu konstatieren, obwohl bekannt ist, daß in stark konzentrierten Würzen, z. B. Bockbierwürze, gezüchtete Hefen eine merkliche Verdickung und unter Umständen auch Schichtung der Zellwände erkennen lassen[2]).

Dagegen wird der Verlauf der Gärung, wie bekannt, außerordentlich durch die Temperatur und die Konzentration der Nährlösung beeinflußt. Bei den Kulturen, welche mit der konzentrierteren Würze (17 Proz. Ball.) angestellt wurden, konnte trotz annähernd gleicher Hefeaussaat und gleicher Temperatur stets eine Verzögerung des makroskopisch wahrnehmbaren Beginnes der Gärung um 10—20 Stunden gegenüber den Kulturen in 10-proz. Würze konstatiert werden. Mit dem Steigen der Temperatur des Nährsubstrates nimmt also die Wachstumsschnelligkeit ab. Beim Studium des Einflusses der Temperatur auf die Gärung konnten zugleich Beobachtungen über die Kardinalpunkte für die Sprossung bei den drei obergärigen Bierhefen gemacht werden. Nach dem Vorgange Hansens[3]) wurden zu diesem Zweck von jeder Hefe zwei mit ziemlich gleicher Aussaat geimpfte Freudenreich-Kölbchen, die etwa 12-proz. Würze enthielten und einige Stunden vor dem Impfen bereits bei der betreffenden Temperatur im Thermostaten gestanden hatten, sowie eine

---

1) Bei Gipsblockkulturen konnte hie und da innerhalb der Plasmastränge, speziell am Kreuzungspunkt zweier oder mehrerer derselben, das Auftreten eines stärker lichtbrechenden Körpers mit ovalen verschwommenen Umrissen beobachtet werden. Möglicherweise hat man es hier mit dem ohne besondere Präparation sichtbaren Zellkern zu tun.

2) Will, H. Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 226.) — Becker, C., Ueber Schichtung und Färbbarkeit der Membran der Hefezellen. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1899. p. 597.)

3) Hansen, E. Chr., Eine vergleichende Untersuchung über die Bedingungen des vegetativen Wachstums und der Entwickelung der Fortpflanzungsorgane bei den Hefen und Schimmelpilzen der Alkoholgärung. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1902. p. 743.)

Kultur im hängenden Tropfen in einer Böttcherschen feuchten Kammer beobachtet. Hierbei ergab sich, daß bei Oberhefe 25 und 170 bei 42—43° keine Sprossung mehr auftritt. Gärung war innerhalb 24 Stunden nicht zu konstatieren, unter dem Mikroskop erwies sich die Mehrzahl der Zellen als tot bezw. stark geschwächt (Färbung mit Methylenblau). Bei Oberhefe Rio hörte dagegen die Sprossung erst bei 44—45° auf. Bei 0° war innerhalb 24 Stunden bei allen drei Hefen Sprossung und Gärung nicht zu beobachten, dagegen konnte bei 5° ein, wenn auch verzögertes Auftreten von Gärung und Sprossung konstatiert werden. Als Optimum für das Wachstum und die Gärung bei den drei beobachteten Hefen sind die Temperaturen von 28—35° anzunehmen; die Schnelligkeit, mit welcher hier die Gärung einsetzt, macht eine genauere Differenzierung fast unmöglich. So konnte z. B. bei 30° schon nach 5—6 Stunden das Einsetzen der Gärung beobachtet werden. Als charakteristisches Unterscheidungsmerkmal kann der Umstand gelten, daß Oberhefe 25 stets später, bei relativ niedriger Temperatur (10°) um 1—2 Tage, die ersten Gärungserscheinungen zeigte als die Stämme Rio und 170[1]).

Bezüglich der Form der während der Gärung gebildeten Bodensätze konnten keine durchgreifenden Unterschiede gefunden werden. Die Ausbildung der Schaumdecke war bei Stamm Rio und 25 gleichmäßig und feinblasig, dagegen bei Stamm 170 stets großblasig und hefereich. Letztere Hefe zeichnete sich auch durch eine frühzeitige starke „Ringbildung“ aus. Die Form der Sproßverbände war bei allen drei obergärigen Hefen die gleiche, im Gegensatz zu den untergärigen Hefen mehr eckig und sparrig[2]); auch kommen seitliche Aussprossungen sehr häufig vor, wogegen bei untergärigen Hefen im allgemeinen mehr eine polare Sprossung zu beobachten ist.

Die Verschiedenheit der Temperatur und der Konzentration der Nährlösung, bei der obige Versuche angestellt wurden, gab zugleich Gelegenheit, einige Beobachtungen über das Verhalten des Glykogens bei den drei obergärigen Hefen unter diesen Verhältnissen anzustellen. Daß die Hefezelle tatsächlich ein Glykogen enthält, welches dem Glykogen der tierischen Leber in der chemischen Zusammensetzung gleichkommt, dürfte wohl jetzt außer Zweifel sein. Wenn auch Salkowsky[3]) glaubt, daß eine Verwechslung mit Erythrocellulose vorliegt, so ist jedoch diese Ansicht durch die Arbeiten von M. Cremer[4]), G. Clautriau[5]) u. a. entschieden widerlegt. Dagegen sind die Anschauungen über die Bedeutung, welche dem Glykogen im Leben der Saccharomyceten und der anderen Pilze zukommt, noch geteilt. Der größere Teil der Gärungsphysiologen, wie Will[6]), Meissner[7]) u. a., betrachtet es als transitorischen

1) Siehe p. 55. Abschnitt VI.

2) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. 3. Aufl. p. 357.

3) Salkowsky, E., Die Kohlehydrate der Hefe. (Berichte der deutschen chem. Gesellschaft. Bd. XXVII. 1895. p. 3325, 3329.)

4) Cremer, E., Zucker und Zelle. (Zeitschrift für Biologie. 1895. Heft 1.)

5) Clautriau, G., Das Glykogen der Pilze und der Hefe. (Belgische Akademie der Wissenschaften, Sitzung vom 6. April 1895; durch Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 277.)

6) Will, H., Die Hefezelle, deren Aussehen und Beschaffenheit in den verschiedenen Stadien ihrer Entwickelung und ihres Zerfallens unter dem Mikroskop. (Allg. Brauer- und Hopfenztg. 1892. p. 1088.)

7) Meissner, G., Das Auftreten und Verschwinden des Glykogens in der Hefezelle. (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. Abt. II. 1900. p. 517.)

Reservestoff, der in der Pilzzelle eine ähnliche Rolle spielt wie die chemisch nahe verwandte Stärke in den Zellen der höheren chlorophyllhaltigen Pflanzen. Henneberg[1]) dagegen ist der Ansicht, daß das Glykogen nur ein Zeichen von reichlicher Anwesenheit von Zucker und ohne besonderen Nutzen für die Hefe sei und deshalb den Namen eines Reservestoffes nicht verdiene. Doch steht wohl Henneberg mit dieser Ansicht vereinzelt da.

Seit der ersten Mitteilung L. Erreras[2]) über das Auftreten von Glykogen in der Hefe liegt eine stattliche Reihe von Arbeiten und Mitteilungen über diesen Körper teils in chemischer, teils in physiologischer Beziehung vor; an dieser Stelle kommen in erster Linie die Arbeit von E. Boullanger und Kayser[3]) und besonders die Resultate der eingehenden Studien Hennebergs in Betracht. Dieselben können durch die mit den drei obergärigen Bierhefen angestellten Versuche vollständig bestätigt werden. Daß die Intensität der Glykogenbildung eine Rasseeigentümlichkeit ist, beweist der Umstand, daß unter gleichen Versuchsbedingungen Stamm Rio einen höheren Prozentsatz glykogenhaltiger Zellen aufwies als Stamm 25 und 170. Auch die Abhängigkeit der Glykogenbildung von den die Gärung beeinflussenden Faktoren der Temperatur und Konzentration der Nährlösung konnte beobachtet werden, da bei den Kulturen, welche bei 30° C in verschiedenen Würzen gezüchtet waren, diejenigen mit 10-proz. Würzen schon nach 6 Stunden eine relativ starke Glykogenbildung erkennen ließen, während in den in höherprozentiger Würze gezüchteten Kulturen erst nach 16—20 Stunden eine größere Anzahl glykogenhaltiger Zellen nachgewiesen werden konnte. Bei niedrigerer Temperatur (10°) fand sowohl eine relativ späte Bildung von Glykogen als auch ein langsameres Verschwinden desselben aus der Zelle statt. Das Glykogen wurde mit verdünnter (ca. 0,1-proz.) Jodlösung nach den Angaben von R. Braun[4]) nachgewiesen. Bei Behandlung der Hefe mit Jodlösung erscheinen in den Zellen zu Beginn der Gärung engumgrenzte, tief dunkelbraun gefärbte Stellen, in zahlreichen Fällen 2—3 in ein und derselben Zelle. Im weiteren Verlauf der Gärung wuchsen diese zerstreuten Glykogenbildungsherde und verschmolzen zu einer mehr oder minder scharf begrenzten Masse, die oft im optischen Querschnitt halbmondförmige Gestalt besaß. Mit Eintritt des Gärungsmaximums zeigten die meisten Zellen nach Behandlung mit Jodlösung eine den ganzen Zellraum ausfüllende Braunfärbung, die indessen gegen die Zellmembran zu etwas heller erschien. Bei der Sprossung verschwand das Glykogen aus der Mutterzelle, um bald jedoch in den Tochterzellen wieder aufzutreten, wie die Behandlung mit Jodlösung ergab. Indessen war auch in den älteren Zellen größerer Sproßverbände, wie besonders bei Hefe Rio und 170 beobachtet werden konnte, das Vorhandensein reichlicher Glykogenmengen zu konstatieren, es scheint also in diesen eine Neubildung des Glykogens stattgefunden zu haben.

---

1) Henneberg, W., Ueber das Vorkommen von Glykogen bei Brennereihefen, Preßhefen und obergärigen Brauereihefen. (Zeitschrift für Spiritusindustrie. 1902. p. 35—39.)

2) Errera, L., Sur l'existence du glykogène dans la levure de bière. (Compt. rend. de l'Académie des Sciences de Belg. 1885. p. 253.)

3) Boullanger, E. und Kayser, E., Ueber die Glykogenbildung in der Hefe. (Ann. Brass. et Destill. 25. Febr. 1898.)

4) Braun, R., Nachweis des Glykogens in Hefezellen. (Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen. 1901. p. 307.)

Das Auftreten von Glykogen auch in den verschiedenen Zellelementen bei der Hautbildung auf flüssigem Nährboden und bei den Wachstumserscheinungen auf festem Nährsubstrat wird in den folgenden Abschnitten noch weitere Erwähnung finden.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß bei den drei obergärigen Hefen in älteren Zellen fast regelmäßig stark lichtbrechende Granula sowohl im Cytoplasma als auch insbesondere bei Hefe 25 in den Vakuolen auftreten. In jungen, kräftigen Zellen der Oberhefen Rio und 170 waren diese Granula nur selten zu beobachten, dagegen waren dieselben regelmäßig in älteren Zellen des Bodensatzes und der Kahmhaut, in toten Zellen und besonders in Riesenzellen vorhanden. In letzteren zeigten sie häufig im optischen Querschnitt eine kranzförmige Anordnung um die Vakuolen. Mit zunehmendem Alter der Kultur nahm auch die Größe der Granula zu, indem oft in den stark hungernden und nicht selten bereits absterbenden Zellen sich die relativ große Anzahl kleiner Körperchen in 2—3 große glänzende, den Sporen „wilder" Hefe nicht unähnliche Tropfen vereinigt hatte. Auch die Granula in den Vakuolen der Oberhefe 25 wuchsen mit zunehmendem Alter der Zellen.

Sowohl die im Cytoplasma als auch die in den Vakuolen vorkommenden Granula lassen sowohl durch die Schwarzfärbung mit 1-proz. Ueberosmiumsäure als auch durch die — allerdings in manchen Fällen nicht eintretende — Rotfärbung mit Alkannatinktur erkennen, daß sie im wesentlichen aus fett- oder ölartigen Substanzen bestehen. Dagegen ergeben sich hinsichtlich ihrer Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln bemerkenswerte Unterschiede. Alkohol, Aether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und verdünnte Alkalilösung, letztere besonders in der Wärme, lösen die kleineren Granula des Plasmas bei genügend langer Einwirkung des Lösungsmittels ziemlich rasch, etwas schwieriger gestaltet sich die Lösung größerer Granula, wenigstens so lange sie nicht durch Zerstörung der Zellmembran aus der Zelle entfernt werden. Den meisten Widerstand setzen jedoch die in den Vakuolen der Oberhefe 25 befindlichen Granula diesen Lösungsmitteln entgegen. Vielleicht werden sie gegen deren Einwirkung durch die aus plasmatischer Substanz bestehende Vakuolenhaut geschützt.

Will[1]) unterscheidet zwei Arten von Granulis in den Zellen der Saccharomyceten. Die Grundsubstanz der ersten Art, der „Oelkörperchen", besteht aus Eiweißverbindungen und ist mit fett- oder ölartiger Substanz durchsetzt; nicht selten überzieht auch diese Grundsubstanz die Fettkörperchen mit einer oberflächlichen Haut, von der aus Fäden und Stränge in das Innere des Körperchens ziehen. Bei der Lösung der Fettsubstanzen bleibt die eiweißartige Grundsubstanz in Form eines feinhäutigen, oft mit Maschenwerk erfüllten Bläschens zurück. Die zweite Art der Granula, die „Oeltröpfchen", besitzen eine derartige protoplasmatische Grundsubstanz nicht.

In vorliegenden Untersuchungen konnte das Vorhandensein eines die Granula umhüllenden Bläschens oder eines Maschenwerkes nach Lösung der Fettsubstanz nicht beobachtet werden. Allerdings ist auch das Vorhandensein desselben nicht ausgeschlossen, nachdem auch die Granula im Plasma und in den Vakuolen sich mit Jodlösung gelb, mit konzentrierter Salpetersäure und Ammoniak orange (Xanthoproteinreaktion) färbten und somit die für Eiweißsubstanzen charakteristischen Reaktionen gaben.

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 18.)

Dagegen konnte die Angabe Wills[1]), daß sich die Granula hinsichtlich ihres Verhaltens gegen konzentrierte Schwefelsäure unterscheiden, vollkommen bestätigt werden. Nach Will färben sich die Granula der Bodensatzhefe, also der gewöhnlichen Alkoholgärungsform, mit konzentrierter Schwefelsäure nicht, dagegen tritt bei den Granulis der Hautzellen, besonders aber der Dauerzellen eine immer intensiver werdende Grünfärbung auf. Letztere Erscheinung wurde auch regelmäßig in den Hautzellen sowie in den als Dauerzellen anzusprechenden Zellen der drei obergärigen Hefen beobachtet, ebenso in den Zellen älterer Riesenkolonieen. Dagegen konnte bei den Granulis der Alkoholgärungsform, sowohl bei den im Plasma als auch bei den in den Vakuolen eingeschlossenen nach der Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure höchstens eine leichte Gelbfärbung konstatiert werden.

III. Sporenbildung.

Bei der Prüfung von Hefen auf Sporenbildung handelt es sich um die Festlegung von zwei Momenten, welche für ihre Charakteristik von Bedeutung sind: um die Ermittelung der Temperaturgrenzen, innerhalb welcher überhaupt eine Bildung von Endosporen stattfindet, und um die Festlegung der Zeit, nach Verlauf welcher bei verschiedenen Temperaturen die ersten Anlagen der Endosporen sichtbar sind.

Die drei obergärigen Bierhefen wurden in bekannter Weise zur Sporenbildung vorbereitet, indem sie wiederholt in frische Bierwürze übergeimpft und 24 Stunden vor dem Anlegen der Sporenkultur nochmals in Würze bei 25° aufgefrischt wurden; dann erfolgte das Anlegen der Kulturen auf sterilisierten feuchten Gipsblöcken. Bei den Oberhefen Rio und 25 genügte eine derartige Behandlung vollständig, um Sporenbildung in den Zellen hervorzurufen. Dagegen ergaben sich bei Hefe 170 anfänglich Schwierigkeiten. Die Kulturen dieser Hefe mußten infolge besonderer Umstände einige Zeit bei höheren Temperaturen (30—35°) gezüchtet werden und zeigten nach dieser Zeit trotz wiederholten Auffrischens der Kulturen keine Neigung zur Sporenbildung. Daß Hefen durch längeres Züchten bei höherer Temperatur das Vermögen der Sporenbildung verlieren, hat auch Hansen[2]) beobachtet; er gibt hierbei ein Mittel an, die Hefen wieder zur Bildung von Endosporen zu bringen, nämlich die Kultur in Dextrosehefewasser. Dieses Mittel hatte auch bei Oberhefe 170 Erfolg, indem nach dem Züchten derselben in dieser Nährlösung und nachfolgendem Auffrischen der Kultur in Würze reichlich Sporenbildung auftrat.

In Bezug auf die Häufigkeit der sporenführenden Zellen ergaben sich bei den drei obergärigen Hefen bemerkenswerte Unterschiede. Die Hefen Rio und 170 zeigten bei der Gipsblockkultur stets einen relativ hohen Prozentsatz von Zellen, welche zum Ascus geworden waren, dagegen war bei der Hefe 25 die Intensität der Sporenbildung eine geringe. Die Fähigkeit, in zahlreichen Zellen Sporen zu erzeugen, blieb der Hefe Rio auch nahe dem Maximum und Minimum der Temperaturgrenzen für die Sporenbildung so ziemlich erhalten, während Hefe 170 und Hefe 25 unter den gleichen Verhältnissen nur schwache Neigung zur Sporenbildung zeigten.

---

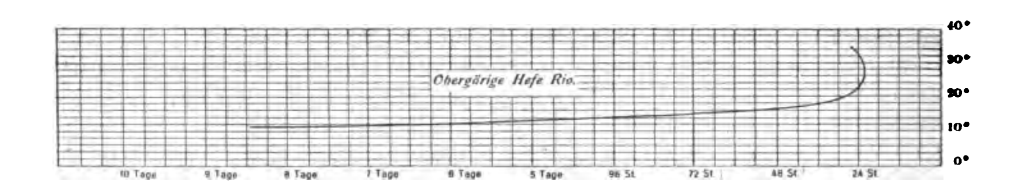
1) Will, H., ibid. 1895. p. 286.

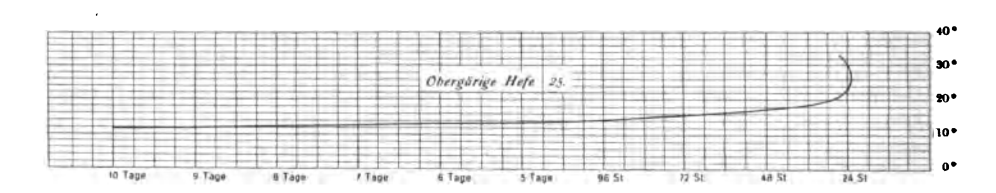
2) Hansen, E. Chr., Ueber die Entstehung von Varietäten bei den Saccharomyceten. (Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen. 1890. p. 145.)

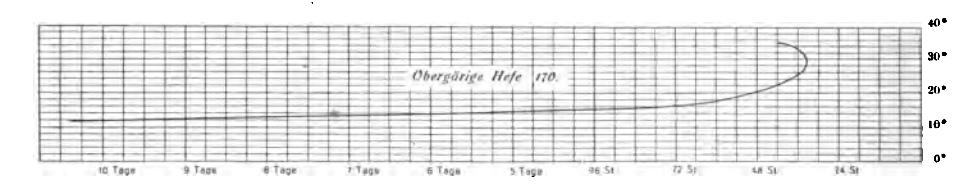
Ueber die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung und über die Abhängigkeit der Sporenbildung von verschiedenen Temperaturen gibt die folgende Tabelle Aufschluß. Als maßgebend für die Festlegung der Zeitpunkte wurde der Moment gewählt, an welchem eben die ersten Sporenanlagen in den Zellen beobachtet werden konnten. Im Nachstehenden sind diese Verhältnisse in sogenannten „Sporenkurven“ graphisch dargestellt, indem die Temperaturen als Ordinaten und die zu diesen gehörigen Zeiten als Abscissen aufgetragen wurden.

Tabelle I.

Temperatur °C	Oberhefe Rio	Oberhefe 25	Oberhefe 170
	Die ersten Sporenanlagen erscheinen nach	Die ersten Sporenanlagen erscheinen nach	Die ersten Sporenanlagen erscheinen nach
37	—	—	—
34—35	26 Stunden	—	42 Stunden
32—33	24 „	26 Stunden	36 „
30—29	23 „	24 „	33 „
27—28	22 „	23 „	34 „
24—25	23 „	24 „	37 „
21—22	25 „	27 „	45 „
17—18	42 „	48 „	60 „
14—15	90 „	95—100 „	ca. 100 „
11—12	8—9 Tagen	9—10 Tagen	10—11 Tagen
8—9	—	—	—







Aus der Tabelle geht zunächst hervor, daß die unterste Temperaturgrenze für die Sporenbildung für alle drei Oberhefen die gleiche ist; bei 8—9° konnte trotz einer Beobachtungsdauer von 3 Wochen keine

Sporenbildung konstatiert werden. Bezüglich des Temperaturmaximums ergaben sich insofern Unterschiede, als bei der Hefe 25 das Maximum für die Sporenbildung etwas tiefer liegt als bei den zwei anderen Hefen. Oberhefe 25 gleicht also sowohl in dieser Beziehung als auch bezüglich ihrer geringen Neigung zur Sporenbildung sehr dem Stamme 7 der von Will[1]) untersuchten untergärigen Bierhefen, der ja ebenso wie Hefe 25 zu den niedrigvergärenden Hefen (Typus Saaz) gehört[2]).

Eine sehr frühzeitige Entwickelung der Sporen, wie sie im allgemeinen für die obergärigen Hefen bekannt und charakteristisch ist, wurde nur bei den Hefen Rio und 25 beobachtet. Beide lassen beim Temperaturoptimum schon nach 22 bezw. 23 Stunden die ersten Sporenanlagen erkennen, zeigen also ähnliche Verhältnisse wie die von Hansen[3]) beschriebene obergärige Hefe Saccharomyces cerevisiae I (jetzt Sacch. cerevisiae E. Chr. Hansen). Dagegen liegt bei Hefe 170 das Optimum etwas höher (29—30°); die Zeit für das Sichtbarwerden der ersten Sporenanlagen beim Temperaturoptimum wurde durch mehrfach wiederholte Versuche bei 33 Stunden festgestellt.

Vergleicht man diese Resultate mit den von Will[1]) für seine vier untergärigen Bierhefen ermittelten Sporenkurven, so ist zunächst ersichtlich, daß bei den drei obergärigen Hefen die Maximaltemperatur für die Sporenbildung im allgemeinen höher liegt. Dagegen liegen die Minimaltemperaturen gleich tief wie bei den untergärigen Hefen, von denen nur Stamm 7 insofern eine Ausnahme macht, als das Temperaturminimum bei dieser Hefe schon bei 13° liegt. Hinsichtlich der Zeitdauer bis zum Sichtbarwerden der ersten Sporenanlagen schließen sich die Oberhefen Rio und 25 der Oberhefe Sacchoromyces cerevisiae E. Chr. Hansen, die Hefen 170 dagegen den vier untergärigen Hefen Wills an. Am besten werden diese Unterschiede wohl durch eine vergleichende Nebeneinanderstellung der untersuchten drei obergärigen Hefen, der obergärigen Hefe Saccharomyces cerevisiae E. Chr. Hansen und der vier untergärigen Bierhefen Wills verdeutlicht.

Tabelle II.

	Bezeichnung der Hefe	Maximum		Optimum		Minimum	
		°C	Die ersten Sporenanlagen werden sichtbar nach	°C	Die ersten Sporenanlagen werden sichtbar nach	°C	Die ersten Sporenanlagen werden sichtbar nach
Hefen obergärige	Rio	34—35	26 Stunden	27—28	22 Stunden	11—12	ca. 8—9 Tagen
	25	32—33	26 „	27—28	23 „	11—12	ca. 10 „
	170	34—35	42 „	29—30	33 „	11—12	ca. 10—11 „
	Sacch. cerev. Hansen	36—37	29 „	30	20 „	11—12	10 „
Hefen untergärige	Stamm 2 (Will)	31	47 „	25	31 „	11	9½ „
	„ 7 „	30	50 „	26	31½ „	13	5½ „
	„ 6 „	31	51 „	28	33½ „	11	11 „
	„ 93 „	30	48 „	28	31 „	10	10½ „

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für d. ges. Brauwesen. 1895. p. 9.)

2) Siehe VI. Abschnitt. p. 55.

3) Hansen, E. Chr., Die Askosporen bei der Gattung Saccharomyces. (Zeitschrift für das ges. Brauwesen. 1883. p. 403.)

Es sei an dieser Stelle gerade darauf hingewiesen, daß die Hefe 170 die Erscheinungen der Obergärung am deutlichsten hervortreten ließ und auch ihr physiologisches Verhalten gegenüber Raffinose[1]) sie als obergärige Bierhefe charakterisierte.

Der Bau der Sporen ist bei den drei obergärigen Bierhefen im wesentlichen derselbe wie bei untergärigen Kulturhefen; die Membran ist deutlich sichtbar, der Inhalt der Sporen meist nicht homogen, sondern oft vakuolisiert. Das Plasma ist etwas stärker lichtbrechend als bei untergärigen Hefen, jedoch nicht in dem Grade, wie es gewöhnlich bei „wilden" Hefen beobachtet wird. Die Anzahl der Sporen in einer Zelle schwankt zwischen 1 und 4. Irgendwelche Unterschiede zwischen den drei obergärigen Hefen bezüglich des Baues der Sporen konnten nicht konstatiert werden; lediglich die Hefe Rio zeichnete sich in vielen Kulturen durch besonders häufiges Auftreten von „Scheidewandbildungen", hervorgerufen durch die stark aufgequollenen und durch die gegenseitige Pressung abgeplatteten Sporen, aus.

Das Hansensche Gesetz, daß bei den Saccharomyceten die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung innerhalb derjenigen für die Sprossung liegen, gilt nach den vorstehenden Untersuchungen also auch für die 3 beobachteten obergärigen Bierhefen.

IV. Hautbildung.

A.

Die Bildung von Häuten auf der Oberfläche flüssiger Nährsubstrate ist bekanntlich eine Eigenschaft, welche den verschiedensten Mikroorganismen, Bakterien, Schimmelpilzen, Saccharomyceten und diesen nahestehenden Pilzformen (Torula) zukommt. Trotzdem wurde diese Erscheinung erst von Hansen[2]) in ihrem vollen Umfang für die Charakterisierung der Saccharomyceten und für die Unterscheidung der einzelnen Arten derselben verwendet. Reess[3]) hat nur einige kurze Andeutungen über diese Art der Vegetation gemacht und auch Pasteur[4]) ist über den Ursprung dieser Erscheinung noch im unklaren; während er einerseits die Ansicht ausspricht, daß die an der Oberfläche vergorener Flüssigkeiten auftretenden Hefezellen eine Entwickelungsform der gewöhnlichen Bodensatzhefe sind, neigt er andererseits doch wieder der Anschauung zu, daß die Hautzellen Formen einer zweiten „aërobischen" Hefeart seien, welche der zu seinen Versuchen verwendeten Hefe beigemischt gewesen sei. Hansen war es auch, der die ersten entwickelungsgeschichtlichen Studien an den Häuten der Saccharomyceten machte, die Abhängigkeit ihrer Bildung von der Temperatur darlegte und das Gesetz aufstellte, daß einerseits die Grenzen der Temperatur für die Hautbildung bei den Saccharomyceten stets tiefer bezw. höher (Temperaturminimum) liegen, als diejenigen für die Sprossung in der Nährflüssigkeit, daß aber andererseits jene höher bezw. niedriger als diejenigen für die Sporenbildung sind. Während so durch Hansen die Grundlagen geschaffen wurden,

1) Siehe VI. Abschnitt. p. 57.

2) Hansen, E. Chr., Ueber die Kahmhäute bei der Gattung Saccharomyces. (Nach Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet, Band II. Heft 4, durch Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1886. p. 374 ff.)

3) Reess, M., Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870. p. 70 ff.

4) Pasteur, L., Études sur la bière. Paris 1876. p. 201 ff.

war es Will[1]) vorbehalten, unsere Kenntnisse über die Entwickelungsgeschichte der Saccharomycetenkahmhäute weiter auszubauen und zu vervollständigen. Da die folgenden Ausführungen sich eng an seine Angaben anschließen, sollen diese nachstehend ihrem wesentlichen Inhalt nach wiedergegeben werden.

Will fand, daß der Beginn der Hautbildung bei untergärigen Hefen morphologisch durch das Auftreten kleiner ovaler Zellen gekennzeichnet ist. Diese entstehen an einzelnen Zellen der Bodensatzform bezw. deren Tochtergenerationen, welche durch die Ausscheidungen der Schaumdecke an der Oberfläche der gärenden Würze oder längs des Flüssigkeitsrandes zurückgehalten werden. Besonders charakteristisch für diese, als „erste Generation echter Hautzellen" bezeichneten Zellformen ist die Erscheinung, daß sie gleichzeitig in größerer Anzahl an ihren Ursprungszellen hervorsprossen. Die anfangs ovalen kleinen Zellen mit homogenem, nur wenige stark lichtbrechende Körperchen (Granula) enthaltendem Plasma strecken sich in den späteren Generationen und es entstehen allmählich Sproßverbände wurstförmiger und gestreckt wurstförmiger Zellen. Diese unterscheiden sich, trotz mancher Aehnlichkeit in der Form, von den in der zweiten Entwickelungsphase auftretenden gestreckten Zellen, durch ihre geringe Größe und vor allem durch ihre zartere Beschaffenheit. Die Zellen der Bodensatzform bezw. deren Tochterzellen, welche an der Oberfläche der gärenden Würze zurückgehalten wurden, bleiben geraume Zeit noch als solche in der Haut zurück. Später verdickt sich ihre Membran sehr stark unter gleichzeitiger Aufspeicherung von Reservestoffen: es bilden sich die für ältere Häute so charakteristischen „Dauerzellen" aus. Diese Dauerzellen entwickeln dann früher oder später Sproßverbände langgestreckter, derber wurstförmiger Zellen. Nicht selten entstehen auch mycelartige Zellen, in welchen Querwände auftreten können. Charakteristisch für die Keimung der Dauerzellen ist auch das Auftreten keulenförmiger Zellen. Diese Sproßverbände langgestreckter derber Formen stellen die zweite Generation echter Hautzellen dar. Die Hautbildungen zeigen also zwei durch festbestimmte Zellformen verschiedener Art charakterisierte Entwickelungsphasen.

Die Beobachtung der Hautbildung in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur bot also nicht allein Gelegenheit, etwaige Unterschiede in dieser Beziehung zwischen den drei behandelten obergärigen Bierhefen festzustellen, sondern ermöglichte auch die Beantwortung der Frage, ob auch bei den obergärigen Hefen ähnliche Zellelemente bei der Bildung und Entwickelung der Häute auftreten, wie die von Will beobachteten und in vorstehendem kurz geschilderten Hautgenerationen bei den untergärigen Bierhefen. Allerdings war es bei den drei obergärigen Hefen nicht ohne Schwierigkeit, den Beginn der Hautbildung zu konstatieren. Wenn auch bei den Laboratoriumsversuchen die Eigenschaft der obergärigen Hefen, eine sehr hefereiche Schaumdecke bei der Gärung zu bilden, nicht immer in gleich starkem Maße hervortrat, so befand sich immerhin nach Beendigung der Hauptgärung eine so große Anzahl bald kleinerer, bald größerer Zellen der Bodensatzform an der Oberfläche der gärenden Flüssigkeit, daß eine sichere Diagnostizierung des Beginnes der Hautbildung nur durch das Auftreten von kleineren Zellformen oder

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1895. p. 17 ff.)

durch die Bildung kleiner Hefeinselchen nicht möglich war. Es wurde vielmehr erst dann der Beginn der Hautbildung als sicher erachtet, wenn kleine glykogenhaltige Zellen mit schwacher Membran und homogenem Inhalt, an einer größeren Zelle der Bodensatzform in größerer Zahl gleichzeitig hervorsprossend, beobachtet werden konnten. Auf diese Weise gelang es, den Beginn der Hautbildung so genau wie möglich festzustellen.

Die Vorbereitung der Kulturen für die Beobachtung der Hautbildung geschah im allgemeinen nach den Angaben, welche Hansen[1]) gemacht hat. Die drei obergärigen Hefen wurden einige Male in frischer Bierwürze gezüchtet, zuletzt 24 Stunden vor dem Anlegen der Hautkultur. Dann wurden sie in Erlenmeyer-Kölbchen übergeimpft, welche ca. $^1/_4$ l Würze enthielten und nach der Sterilisation im strömenden Dampf noch 14 Tage zur Lüftung der Würze stehen geblieben waren. Nach erfolgter Impfung wurde der Wattebausch der Kölbchen, wie üblich, abflambiert und mit sterilem Filtrierpapier überbunden. Hierauf blieben die Kölbchen bei der beabsichtigten Beobachtungstemperatur ruhig im Thermostaten stehen. Die Versuche erfolgten meistens in 4-facher Ausführung, in einzelnen Fällen wurden die Beobachtungen in 8—10-facher Ausführung zu verschiedenen Zeiten wiederholt. Hierbei konnte jedesmal eine genügende Uebereinstimmung in den Resultaten erhalten werden.

Was die Entwickelung der Haut bei den beobachteten drei obergärigen Bierhefen Rio, 25 und 170 betrifft, so war sie in den Grundzügen bei allen drei Hefen die gleiche und zeigte keinerlei Unterschiede von den bei der Hautbildung untergäriger Bierhefen auftretenden Erscheinungen, soweit sie makroskopisch festgestellt werden können. Bei den drei Oberhefen zeigten sich bald nach dem Zurückgehen der durch die Gärung erzeugten Schaumdecke kleine, weiße, trocken aussehende Hefeflecke, welche allmählich größer wurden und sich schließlich zu einer je nach dem Alter der Kultur mehr oder weniger dicken, weißgelben, rahmartigen Haut vereinigten. Diese Haut bedeckte die Oberfläche der Nährflüssigkeit fast vollständig, wurde jedoch schon bei der geringsten Erschütterung auseinander gerissen, wobei namentlich die unteren Teile in Fetzen zu Boden sinken. Gleichzeitig mit der Bildung der Haut erfolgt auch in den meisten Fällen rings an der Wand des Kulturgefäßes der Oberfläche der Würze folgend die Bildung eines „Heferinges“, wie dies auch bei untergärigen Hefen der Fall ist. Derselbe nimmt seinen Ursprung von den Ausscheidungen der Schaumdecke bei der Gärung, welche am Glase haften geblieben waren, bleibt zunächst auf einige Hefeflecke beschränkt, die sich aber mehr und mehr ausbreiten, so daß nach geraumer Zeit ein geschlossener Ring entsteht, der in alten Kulturen, welche erst nach etwa einem Jahr zur Beobachtung kamen, eine Höhe von 4—6 mm und eine Dicke von 2—3 mm erreicht hatte. Nicht selten war in alten Kulturen durch Verdunstung die Oberfläche der Würze derart gesunken, daß der Hefering einige Millimeter von ihr entfernt war und seinen Zusammenhang mit der Haut scheinbar vollständig verloren hatte. Die Zellelemente, welche sich sowohl an der Zusammensetzung der Haut als auch an dem Aufbau des nach Will[2]) ihr voll-

1) Hansen, E. Chr., Ueber die Kahmhäute bei der Gattung Saccharomyces. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1886. p. 379.)

2) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1895. p. 20.)

ständig äquivalenten Heferinges beteiligen, sollen im folgenden eingehender beschrieben werden.

Die in den nachstehenden Tabellen verzeichneten Beziehungen zwischen dem Beginn der Hautbildung und der Temperatur bei den beobachteten drei obergärigen Hefen resultierten nur aus Versuchen, welche in der oben erwähnten Art in Erlenmeyer-Kölbchen mit ca. 12-proz. Braunbierwürze angestellt wurden. Mehrfache Versuche mit Rundkölbchen, Freudenreich-Kölbchen und Pasteur-Kolben ergaben, daß die Form der Wandungen der Kulturgefäße nicht ohne Einfluß auf die Ausbildung der Haut und insbesondere des Heferinges ist. Auch zeigten Versuche mit höher konzentrierten Würzen (17 Proz. Ball.), daß starke Konzentration der Nährlösung das Wachstum der Haut ziemlich verlangsamt; in den meisten Fällen fanden sich bei 25° auch nach mehrwöchiger Beobachtungsdauer nur Fragmente einer Hautbildung auf höher konzentrierten Würzen vor, der Hefering dagegen war zu besonders starker Entwickelung gediehen. Geringere chemische Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährlösung, wie sie durch die Verwendung von Braunbier- oder Weißbierwürze bedingt sind, hatten keinen wesentlichen Einfluß auf die Bildung und Entwickelung der Haut und des Heferinges.

Für die einzelnen Hefen ergaben sich nachstehende Daten, wobei bemerkt sein möge, daß die beigesetzten Temperaturen sowie die Zeitangaben nur abgerundete Mittelwerte darstellen.

Oberhefe Rio.

37—38°. Nach vierwöchentlicher Beobachtung konnte weder Haut- noch Ringbildung konstatiert werden.

34—45°. Am 6. Tage: Beginn der Ringbildung.

Am 9.—15. Tage: Schwache Hautbildung vom Ringe aus. Auftreten schwach entwickelter Hefeinselchen mit zahlreichen echten Hautzellen, letztere häufig gestreckt-oval.

Nach 25 Tagen sind in der rahmartigen Haut wenige wurstförmige Zellen mit zarter Membran und homogenem Plasma zu beobachten.

32—33°. Am 6. Tage: Entwickelung eines Heferinges.

Am 8.—12. Tage: Schwache Hautinselchen, vom Ringe aus sich bildend. Echte Hautzellen von ovaler und gestreckter Form, in größerer Zahl „morgensternartig“ an größeren Zellen der Bodensatzform sitzend.

Nach 25 Tagen treten in der gut entwickelten Haut Sproßverbände wurstförmiger Zellen (1. Hautgeneration) auf.

29—30°. Am 4. Tage: Beginn der Heferingbildung.

Am 7.—9. Tage: Ziemlich häufig kleine Hefeinselchen sowohl vom Ringe aus als auch in der Mitte der Würzeoberfläche sich bildend. Echte Hautzellen sind zahlreich vorhanden.

Nach 13—17 Tagen treten in der stark entwickelten Haut große Sproßverbände wurstförmiger zarter Hautzellen auf.

27—28°. Am 3. Tag: Beginn der Ringbildung.

Am 6.—9. Tage: Bildung zahlreicher typischer Hefeinseln mit gestreckt-ovalen und ovalen Hautzellen.

Nach 11—14 Tagen kann in der dicken rahmartigen Haut die Bildung großer Sproßverbände aus zarten wurstförmigen Zellen der 1. Hautgeneration beobachtet werden.

24—25°. Entwickelung eines Heferinges.

Am 10.—15. Tage: Ziemlich häufig kleine Hefeinseln, größtenteils auf der Mitte der Würzeoberfläche. Echte Hautzellen der 1. Generation.

Nach 16—20 Tagen erfolgt die Bildung größerer Sproßverbände zarter wurstförmiger Zellen.

21—22°. Am 5. Tage: Beginn der Ringbildung.

Am 10.—17. Tage: Anfang der Hautbildung mit echten ovalen Hautzellen.

Nach 19—25 Tagen sind gestreckt-wurstförmige Zellen in der gut entwickelten Haut zu beobachten. Im Hefering finden sich nicht selten runde Zellen mit verdickter Membran, Glykogengehalt und zahlreichen Oelkörperchen (Dauerzellen).

17—18°. Am 7. Tage: Ringbildung.

Am 15.—20. Tage: Auftreten einiger Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 25 Tagen hat sich eine mäßig starke Haut mit zahlreichen echten Hautzellen, meist von ovaler Form, gebildet. Vereinzelt treten große Sproßverbände wurstförmiger zarter Zellen auf. Im Hefering Dauerzellen.

14—15°. Am 10. Tage: Schwache Ringbildung.

Am 17.—23. Tage zeigen sich Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 4 Wochen ist die Haut ziemlich stark entwickelt. Vereinzelte Sproßverbände zarter wurstförmiger Zellen. Im Hefering Dauerzellen.

11—12°. Nach 20 Tagen schwach entwickelter Hefering.

Nach 4 Wochen zeigen sich einzelne Hefeinseln mit kleinen ovalen Hautzellen. Langgestreckte wurstförmige Zellen sind in dieser Zeit nicht zu beobachten. Der Hefering besteht größtenteils aus Dauerzellen.

8—9°. Nach sechswöchentlicher Beobachtung waren nur schwache Ringfragmente vorhanden, die aus Zellen mit verdickter Membran und größeren Vakuolen bestanden.

5—6°. Nach 6 Wochen weder Haut- noch Heferingbildung.

Oberhefe 25.

37—38°. Nach 4 Wochen weder Hefering noch Hautbildung.

34—35°. Nach 3 Wochen wurden einzelne Hefeflecke am Flüssigkeitsrande konstatiert; echte Hautzellen sind indessen nicht nachzuweisen.

32—33°. Am 8.—12. Tage: Ringbildung nicht vorhanden. Vereinzelte Hefeinselchen mit echten Hautzellen 1. Generation, teils oval, teils kurz wurstförmig mit sehr zarter Membran (Länge 10—12 μ, Breite 2—3 μ).

Nach 4 Wochen sind vereinzelt Sproßverbände gestreckt-wurstförmiger Zellen (Länge 15—20 μ) mit zarter Membran und homogenem Inhalt zu beobachten.

29—30°. Am 6.—10. Tage: Ringbildung ist nicht vorhanden. Hefeinseln mit echten ovalen Hautzellen.

Nach 14—18 Tagen treten in der gut entwickelten Haut große Sproßverbände gestreckt-wurstförmiger Zellen auf.

27—28°. Am 5.—10. Tage: Sehr schwache Andeutung einer Ringbildung. Auftreten von Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 12—17 Tagen sind in der gut entwickelten Haut zahlreiche Sproßverbände gestreckt—wurstförmiger Zellen zu beobachten.

24—25°. Am 6.—10. Tage treten Hefeinseln mit echten Hautzellen auf. Ringbildung kaum vorhanden.

Nach 15—20 Tagen ist die Haut gut entwickelt. Große Sproßverbände wurstförmiger Zellen. Vereinzelt Dauerzellen.

21—22°. Am 9.—15. Tage: Bildung von Hefeinseln mit echten Hautzellen. Ringbildung fehlt.

Nach 17—25 Tagen ist in der stark entwickelten Haut das Vorkommen von großen Sproßverbänden wurstförmiger zarter Zellen zu beobachten. Schwacher Hefering; derselbe besteht größtenteils aus Zellen mit verdickter Membran (Dauerzellen).

17—18°. Am 12.—17. Tage ist schwache Ringbildung zu beobachten. In der Mitte der Würzeoberfläche vereinzelte Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach ca. 3 Wochen ist in der ziemlich gut entwickelten Haut das Auftreten zarter wurstförmiger Zellen in großen Sproßverbänden zu konstatieren. Im Ring Dauerzellen.

14—15°. Am 16.—20. Tage ist nur sehr schwache Ringbildung vorhanden. Vereinzelt Hautinseln mit echten Hautzellen.

Nach 2 Monaten besteht die schwach entwickelte Haut größtenteils aus Zellen mit verdickter Membran. Zarte wurstförmige Zellen, zumal in Sproßverbänden, sind selten.

11—12°. Nach 3 Wochen ist schwache Ringbildung vorhanden. Keine Hautinseln. Im Ring echte Hautzellen in reichen Sproßverbänden. Wurstförmige zarte Zellen sehr selten. Zahlreich sind Dauerzellen, größtenteils rund. Nach 1 Monat einzelne Hautflecke.

8—9°. Nach sechswöchentlicher Beobachtung weder Ring- noch Hautbildung.

5—6°. Ebenfalls nach 6 Wochen kein Anzeichen von Haut- oder Heferingbildung.

Oberhefe 170.

37—38°. Nach 4 Wochen ist weder eine Hautbildung noch ein Hefering zu konstatieren.

34—35°. Am 5. Tage: Beginn der Ringbildung.

Am 9.—13. Tage: Hefeinseln mit echten Hautzellen (spitzoval und birnförmig). Im Ring befinden sich häufig Zellen mit wurst- und birnförmigen Tochterzellen.

Nach 4 Wochen ist der Ring sehr stark, jedoch ungleichmäßig entwickelt. Im Hefering befinden sich runde bis ovale Zellen mit verdickter Membran, deren Plasma durch große Vakuolen stark reduziert ist. Zahlreiche langgestreckte Zellen mit zarter Membran und homogenem Plasma (oft Birn- und Keulenform).

32—33°. Am 5. Tage: Beginn der Heferingbildung.

Am 7.—11. Tage: Einzelne Hefeinseln, viele Bodensatzzellen, jedoch auch echte Hautzellen enthaltend.

Nach 16—20 Tagen ist die Haut gut entwickelt, sie enthält große Sproßverbände zarter wurst- und birnförmiger Zellen. Im Hefering auch Zellen mit verdickter Membran und großen Vakuolen.

29—30°. Am 4. Tage: Ringbildung.

Am 6.—10. Tage: Zahlreiche Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 15—18 Tagen sind in der mäßig starken Haut große Sproßverbände von zarten wurst- und birnförmigen Zellen vorhanden. Oft dickwandige Zellen mit reduziertem Plasma.

27—28°. Am 4. Tage: Beginn der Ringbildung.

Am 7.—10. Tage: Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 15—20 Tagen treten in der gut entwickelten Haut langgestreckte Formen auf. Im Hefering runde und ovale Zellen mit dicker Membran und großen Vakuolen.

24—25°. Am 5. Tage: Anfang der Heferingbildung.

Am 9.—12. Tage: Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 18—25 Tagen sind Haut und Hefering gut entwickelt. Sproßverbände wurst- und birnförmiger Zellen. Im Ring auch Zellen mit verdickter Membran und großen Vakuolen.

21—22°. Am 6.—7. Tag: Beginn der Ringbildung.

Am 11.—15. Tage: Hefeinseln mit echten Hautzellen.

Nach 20—25 Tagen starker Ring und mäßig starke Haut. In letzterer befinden sich große Sproßverbände zarter wurstförmiger Zellen. Im Ring auch runde und ovale Zellen mit verdickter Membran.

17—18°. Am 6.—7. Tage: Beginn der Heferingbildung.

Am 14.—18. Tage: Beginn der Hautbildung; echte Hautzellen.

Nach 4 Wochen ist Ring und Haut stark entwickelt. Große Sproßverbände wurstförmiger Zellen und runde oder ovale Zellen mit verdickter Membran und reduziertem Plasma.

14—15°. Am 10. Tage: Entwickelung des Heferinges.

Am 17.—25. Tage: Entwickelung schwacher Hautinseln vom Ring aus; echte Hautzellen.

Nach 4 Wochen ist die Haut nur mäßig entwickelt; selten größere wurstförmige Zellen. Der stark entwickelte Hefering besteht größtenteils aus runden Zellen mit verdickter Membran.

11—12°. Am 16.—20. Tage: Beginn der Heferingbildung mit echten Hautzellen.

Nach 6 Wochen zeigen sich einzelne Hautflecke. Auch nach 14 Monaten ist eine stärkere Entwickelung der Haut, die fast ausschließlich aus echten Dauerzellen besteht, nicht zu konstatieren. Hefering stark entwickelt.

8—9°. Nach 6 Wochen schwache Ringbildung. Echte Hautzellen sind nur selten zu beobachten.

5—6°. Nach 6 Wochen ist weder Haut noch Hefering vorhanden.

Bei einer Vergleichung dieser drei Tabellen geht zunächst hervor, daß die drei obergärigen Hefen bei den Temperaturen von 30—25° wenig Unterschiede hinsichtlich des Beginnes der Hautbildung zeigen; nur Hefe 25 weist eine geringe Neigung auf, rascher zur Hautbildung überzugehen als die Hefen Rio und 170. Hinsichtlich des Optimums, Maximums und Minimums für die Hautbildung ergaben sich jedoch bemerkenswerte Unterschiede. Stamm Rio und Stamm 170 zeigen schon bei 34—35° schwache Hautbildung, bei Stamm 25 liegt dagegen das Temperaturmaximum wesentlich niedriger (etwa bei 32—33°). Das Temperaturminimum liegt für die Oberhefen Rio und 25 etwa bei 11°, für Hefe 170 vielleicht etwas niedriger (9°). Hinsichtlich des Temperaturoptimums für die Hautbildung ist Oberhefe 170 von den Hefen Rio und 25 verschieden, da erstere Hefe bei 29—30°, letztere beiden bei 27—28° am frühesten Anfänge zur Hautbildung zeigen. Es ergeben sich in dieser Beziehung also im allgemeinen ähnliche Verhältnisse wie bei der Sporenbildung.

Nach dem von Hansen[1]) aufgestellten Gesetz sind auch für die

---

1) Hansen, E. Chr., Die Kahmhäute der Gattung Saccharomyces. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1886. p. 374 u. ff.)

drei obergärigen Hefen Rio, 25 und 170 die Temperaturmaxima und die Temperaturminima für die Sprossung höher bezw. tiefer als die für die Hautbildung, dagegen liegen die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung innerhalb derjenigen für die Hautbildung.

Als charakteristischer Unterschied für Oberhefe 25 kann ihre geringe Neigung zur Bildung eines Heferinges gelten, besonders bei höheren Temperaturen. Es mag dies darauf zurückzuführen sein, daß Hefe 25 an und für sich weniger die Erscheinungen der Obergärung zeigte als die beiden anderen Hefen, vor allem Hefe 170, obwohl sie im übrigen eine ausgesprochene obergärige Hefe war. Infolgedessen scheint das Absetzen von Hefezellen der Alkoholgärungsform am Rande der Würzeoberfläche nicht in dem Maße bei Hefe 25 stattzufinden, daß sich schon vor der Hautbildung das Auftreten sines Heferinges erkennen läßt. Während also bei den Oberhefen Rio und 170 die Hautbildung durch die Entwickelung eines Heferinges eingeleitet wird, scheint bei Stamm 25 die Bildung des Ringes erst nachträglich von der Haut aus zu erfolgen. Im übrigen war nahe dem Temperaturminimum für die Hautbildung bei allen drei Hefen lediglich die Entwickelung eines mehr oder weniger zusammenhängenden Heferinges und höchstens die Bildung einiger Hautfragmente zu beobachten. Dies zeigte sich besonders an Parallelkulturen der drei Hefen, welche über 1 Jahr lang bei einer Temperatur von 8 bis 10° gestanden hatten und auch nach dieser Zeit noch so gut wie keine Hautentwickelung aufwiesen.

Die Hautbildung war bei allen drei Oberhefen eine sehr intensive, bei den Temperaturen, 30—18° war oft die ganze Oberfläche der Würze mit einer gleichmäßigen, dicken, weißgelben Haut bedeckt, von deren Unterseite einzelne Fetzen herabhingen und bei der geringsten Erschütterung, oft auch spontan zu Boden sanken. Die frühzeitige Entwickelung einer starken Haut bildet für die drei obergärigen Hefen einen bemerkenswerten Unterschied gegenüber den untergärigen Arten, wie sie von Will[1]) beobachtet wurden, ebenso scheinen bei den obergärigen Hefen die oberen Temperaturgrenzen — ebenso wie für die Sporenbildung — auch für die Hautbildung höher zu liegen, da die vier untergärigen Stämme Wills bei Temperaturen von wenig über 30° keine Hautbildung mehr aufweisen. Die unteren Temperaturgrenzen liegen aber bei diesen untergärigen Stämmen im allgemeinen etwas tiefer als bei den drei obergärigen Hefen. In nachstehender Tabelle sind die betreffenden Zahlen zusammengestellt, wobei besonders die schon bei der Sporenbildung auftretende Aehnlichkeit der Oberhefe 25 mit der untergärigen Hefe 7 der Willschen Untersuchungen besonders auffällt. Ebenso wie bei der Sporenbildung sind auch hier die von Hansen[2]) ermittelten Kardinalpunkte der Temperatur für die Hautbildung bei Saccharomyces cerevisiae E. Chr. Hansen angegeben.

(Siehe Tabelle p. 24.)

Soweit die Verschiedenheit der Versuchsanstellung und der Beobachtungsdauer Schlüsse zulassen, tritt also tatsächlich die Hautbildung bei den obergärigen Hefearten bei höheren Temperaturen und in kürzerer Zeit ein als bei den untergärigen Arten der Bierhefe.

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1905. p. 25 ff.)

2) Hansen, E. Chr., Ueber die Kahmhäute bei der Gattung Saccharomyces. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1886. p. 381.)

Bezeichnung der Hefe		Temperatur-maximum		Temperatur-optimum		Temperatur-minimum	
		°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit
Hefen, obergärige	Rio	34—35	9—15 Tage	27—28	6— 9 Tage	11—12	4 Wochen
	25	32—33	8—12 „	27—28	5—10 „	11—12	3 „
	170	34—35	9—13 „	29—30	6—10 „	8— 9	6 „
	Sacch. cerev. Hansen	33—34	9—18 „	20—22	7—10 „	6— 7	2— 3 Monate
Hefen, untergärige	Stamm 93 (Will)	31	18 „	25	9 „	7	3 „
	„ 2 „	30	13 „	26	5 „	7	31 Tage
	„ 6 „	30	13—20 „	25	7—11 „	7	1— 3½ Monate
	„ 7 „	28	16—21 „	25	5— 9 „	7	31—38 Tage

Hinsichtlich der Zellelemente, welche bei den drei obergärigen Hefen in den verschiedenen Entwickelungsstadien der Haut auftreten, bestehen zwischen denselben nur sehr geringe Unterschiede. Lediglich die Form der Zellen konnte einige Anhaltspunkte ergeben.

Bei der Oberhefe Rio waren bei Beginn der Hautbildung in den Hefeflecken, welche nach der Hauptgärung zurückgeblieben waren, noch zahlreiche Zellen der Alkoholgärungsform vorhanden. Diese Hefeflecke waren gelbbraun gefärbt, erst nach einiger Zeit begannen sie eine weißgelbe Farbe und mehr schleimige Beschaffenheit anzunehmen. In diesem Stadium sind kleine ovale bis kurz-wurstförmige Zellen vorherrschend, ihre Länge beträgt 7—9 μ, der Breitendurchmesser 4—5 μ, bei den wurstförmigen Zellen noch weniger. Diese wurstförmigen Zellen sind besonders bei höheren Temperaturen zu beobachten; wie ja überhaupt Hefe Rio bei höherer Temperatur eine Tendenz zur Streckung der Zellen zeigt. Die Zellmembran ist im Unterschied von der Membran der in den Kräusenauscheidungen zurückgehaltenen Bodensatzzellen sehr zart, der Zellinhalt im allgemeinen homogen und stark glykogenhaltig. Diese zartwandigen Zellen mit homogenem Plasma sprossen aus den in den Hautinseln befindlichen Bodensatzzellen oder deren Tochterzellen hervor, meist drei bis vier an einer Zelle, oft auch in größerer Anzahl, besonders in jungen Ringbildungen, so daß die Mutterzellen oft sternartig von den kleineren zartwandigen Zellen besetzt sind. Diese letzteren entsprechen also vollständig den bei den untergärigen Bierhefen auftretenden gleichgestalteten Zellen bei den Anfängen der Hautbildung, die von Will als 1. Generation der Hautzellen bezeichnet werden.

Im Laufe der weiteren Entwickelung der Haut treten nach bestimmter Zeit die Zellen der Alkoholgärungsform fast vollständig zurück, so daß die Hautzellen der 1. Generation beinahe ausschließlich die Haut zusammensetzen. Doch machen sich bald auch andere Formen bemerkbar. Nach 2—3 Wochen bei mittlerer Temperatur werden in der inzwischen stark ausgebildeten Haut große Sproßverbände langgestreckter wurstförmiger Zellen sichtbar. Diese sind 3—4 μ breit, 12—15 μ lang, besitzen zarte Membran, im Anfang auch homogenen stark lichtbrechenden Inhalt und zeigen deutliche Glykogenreaktion. Diese Eigenschaften, sowie die nicht selten zu beobachtende Abstammung von kleinen ovalen Hautzellen weisen darauf hin, daß diese Sproßformen ebenfalls noch als Hautzellen 1. Generation anzusprechen sind. Uebrigens kommt es nicht selten vor, daß einzelne dieser wurstförmigen Zellen ihrerseits wieder kleine ovale Hautzellen erzeugen. Diese sprossen meist aus den Schmalseiten der langgestreckten Zellen hervor; ihre Ansatzstelle ist

auch nach dem Abfallen durch eine kurze „sterigmenähnliche“ Ausstülpung der Mutterzelle kenntlich (p. 27, Fig. 6a).

Der Hefering besteht bei Beginn der Hautbildung fast ausschließlich aus Zellen der Bodensatzform, welche stark verdickte Membran und körnigen Zellinhalt, oft auch größere Vakuolen besitzen. Bei Beginn der Entwickelung von Hautzellen 1. Generation werden diese auch häufig im Hefering beobachtet. Doch treten nach einiger Zeit neue Zellelemente auf. Es sind dies Zellen von runder oder wenigstens rundlicher Form und der Größe der Bodensatzzellen. Ihre Membran ist stark verdickt, das Zellplasma enthält eine größere Anzahl von „Oelkörperchen“, die sich oft gerade gegen einen bestimmten Platz in der Zelle zusammendrängen, Vakuolen sind klein und relativ selten, der Gehalt an Glykogen ist meist deutlich nachzuweisen. Diese Zellen sind die ersten Repräsentanten einer Zellform, welche in späteren Stadien der Hautbildung bei Oberhefe Rio oft ausschließlich auftritt und nach allen morphologischen und physiologischen Merkmalen den „Dauerzellen“ der vier untergärigen Sorten Wills entsprechen. Die genauere Begründung der Identität dieser Zellen mit den Dauerzellen soll im 2. Teil dieses Abschnittes erfolgen.

Der Beginn der Hautbildung bei Oberhefe 25 vollzieht sich im allgemeinen ebenso wie bei der Hefe Rio. Bemerkenswert ist hier, wie schon hervorgehoben wurde, daß die Ringbildung eine spärliche ist und in vielen Kulturen gar nicht auftritt. Die Hautzellen 1. Generation zeigen alle charakteristischen Merkmale, zarte Membran, homogenes Plasma und starken Glykogengehalt. Sie sprossen ebenfalls zahlreich an einzelnen Zellen hervor, welche die Größe und Form der Bodensatzzellen besitzen und neben reicher Vakuolisierung eine geringe Verdickung der Zellmembran aufweisen. Sie sind rund bis oval, 5—6 μ groß und oft in ziemlich langen Sproßverbänden vereinigt. In den Vakuolen älterer Hautzellen befinden sich oft Vakuolenkörperchen (Granula). Ebenso wie bei Oberhefe Rio treten nach einiger Zeit in der stark entwickelten weißgelben Haut Sproßverbände langer wurstförmiger Zellen mit zarter Membran und homogenem, glykogenhaltigem Plasma auf. Sie messen etwa 12 μ in der Länge und 2—3 μ in der Breite. In älteren Häuten sind sie so gut wie gar nicht zu finden, sie kommen nur kurz nach Vollendnng der Hautbildung vor. Ihre Abstammung aus unzweifelhaften Hautzellen 1. Generation, sowie das Aussprossen solcher aus ihnen, kennzeichnet sie als Elemente, welche ebenfalls noch der 1. Generation der Hautzellen angehören. Sie verschwinden verhältnismäßig frühzeitig, um einem neuen Element in der Entwickelung der Haut Platz zu machen, den Dauerzellen, welche ebenso wie bei der Oberhefe Rio in sehr typischer Form, sowohl in den Häuten als auch im Hefering älterer Kulturen zahlreich auftreten.

Oberhefe 170 zeigt die Erscheinungen der Obergärung von allen drei Hefen am deutlichsten, die Schaumdecke bei der Gärung ist sehr hefereich und so kommt es, daß beim Zurückgehen des Schaumes bereits ein deutlich ausgeprägter Ring, der fast ganz geschlossen ist, an der Wand des Kulturkolbens sichtbar wird. Doch ist derselbe noch aus Zellen der Bodensatzform zusammengesetzt, welche meist eine geringe Verdickung der Membran aufweisen. Erst mit Beginn der eigentlichen Hautbildung treten sowohl im Ring wie in den an der Würzeoberfläche zurückgebliebenen Hefeflecken zahlreiche zartwandige Zellen mit homogenem Plasma und starkem Glykogengehalt auf, also echte Hautzellen

1. Generation. Diese scheinen leicht von ihrer Mutterzelle abzufallen, da sie selten in größerer Zahl an einer Zelle der Bodensatzform zu finden sind. Sie sind ca. 5—7 μ groß und 3—4 μ breit. Ihre Gestalt bietet ein gutes Unterscheidungsmerkmal gegenüber den Oberhefen Rio und 25; sie sind größtenteils spitz-eiförmig oder keilförmig, doch ist auch die Birn- und Keulenform nicht selten. Auch wurstförmige Zellen von 8—9 μ Länge und 2—3 μ Breite kommen in kurzen Verbänden von drei bis vier Zellen vor. Aehnliche Formen besitzen die langgestreckten Zellen, welche im Verlauf der weiteren Hautentwickelung in großen Sproßverbänden auftreten. Im allgemeinen beträgt ihre Länge je nach der Form 10—15 μ, die Breite 4—6 μ. Sie stammen großenteils von typischen Hautzellen 1. Generation ab und zeigen alle Eigenschaften, welche sie ebenfalls als solche charakterisieren, also zarte Membran, homogenes Plasma und reichen Glykogengehalt. Auch bei diesen Zellen zeigt sich die Neigung der Oberhefe 170, verhältnismäßig rasch zu vakuolisieren.

Im Hefering wie in der Haut der Hefe 170 beherrschen die Hautzellen 1. Generation, teils größere wurst- und birnförmige, teils kleinere spitz-eiförmige lange Zeit das Bild. Erst nach 2—3 Monaten werden bei Zimmertemperatur typische Dauerzellen gebildet. Zwar sind bereits mit Beginn der Heferingbildung Zellen mit ziemlich starker Membran vorhanden, doch fehlen denselben die Oehlkörperchen, sowie das Glykogen. Das Plasma ist meistens durch große Vakuolen bis auf einen dünnen Schlauch an der Zellwand reduziert. In der Haut sind auch in späteren Stadien ihrer Entwickelung echte Dauerzellen nie besonders zahlreich vorhanden, häufiger sind sie dagegen in älteren Heferingen zu finden.

Die lang andauernde Vorherrschaft der Hautzellen 1. Generation in den mannigfachsten, teilweise recht absonderlichen Formen und das relativ späte Auftreten typischer Dauerzellen in der Haut bilden ein deutliches und charakteristisches Merkmal für die Differenzierung der Oberhefe 170 gegenüber den Hefen Rio und 25. In dieser Beziehung scheint also Oberhefe 170 dem untergärigen Hefestamm 7 näher zu stehen, als die diesem Stamm in vielen sonstigen Eigenschaften ähnliche Oberhefe 25.

Nach vorstehenden Beobachtungen lassen sich somit zwei deutlich getrennte Gruppen hinsichtlich der Hautbildung bei den drei obergärigen Bierhefen unterscheiden, deren eine die Oberhefen Rio und 25, deren andere die Oberhefe 170 bildet.

B.

Die im vorstehenden Teil bei den einzelnen Hefen beschriebenen Zellelemente der Kahmhäute herrschen in diesen während der ersten Wochen vor. Erst nach 4—5 Wochen treten in größerer Anzahl Zellen auf, welche durch ihre regelmäßige kugelförmige Gestalt, durch starke Membranverdickung und durch reichen Gehalt des Plasmas an starkglänzenden Tröpfchen besonders auffallen. Mit diesen Zellen tritt bei den obergärigen Bierhefen in gleicher Weise wie bei den untergärigen ein neues charakteristisches Element in der Entwickelung der Haut in Erscheinung; diese Zellen sind von Will[1]) als den Chlamydosporen

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe; Abschnitt IV: Die Dauerzellen. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 217 ff.)

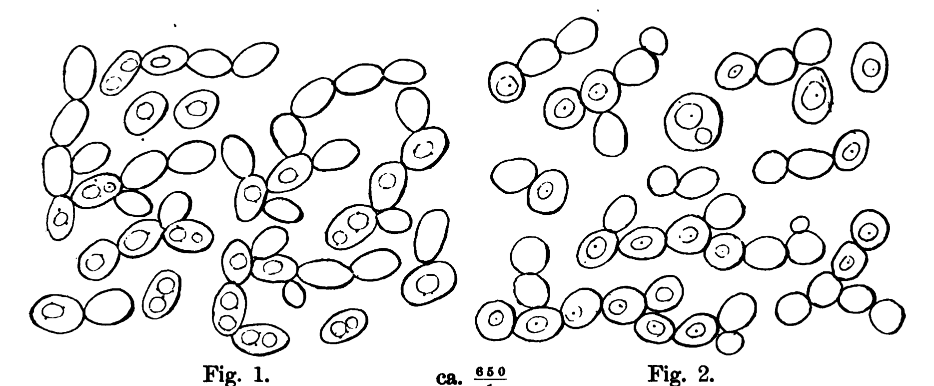


Fig. 1. ca. $\frac{650}{1}$ Fig. 2.

Fig. 1. Zellen der Alkoholgärungsform der Oberhefe Rio in jungen Würzekulturen (20°).

Fig. 2. Zellen der Alkoholgärungsform der Oberhefe 25 in jungen Würzekulturen (20°).

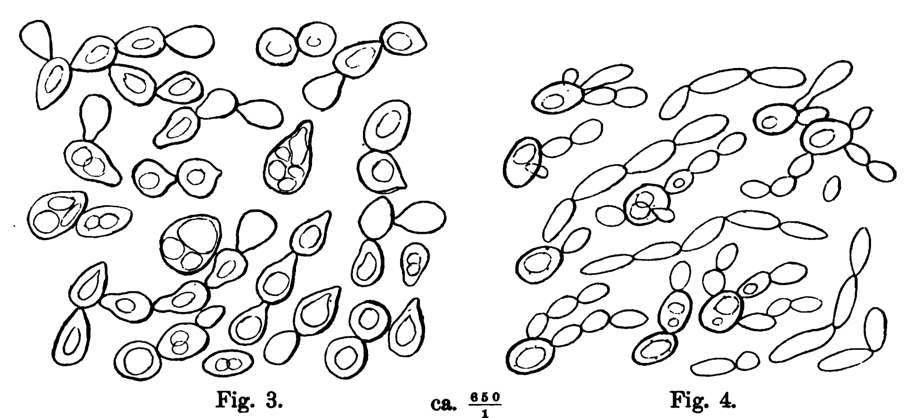


Fig. 3. ca. $\frac{650}{1}$ Fig. 4.

Fig. 3. Zellen der Alkoholgärungsform der Oberhefe 170 in jungen Würzekulturen.

Fig. 4. Zellen der Oberhefe Rio aus einer jungen Kahmhaut bei 25°. Die kleinen gestreckt-ovalen und ovalen, ferner die wurstförmigen Zellen sind Hautzellen 1. Generation, welche aus den Zellen der Alkoholgärungsform hervorgehen.

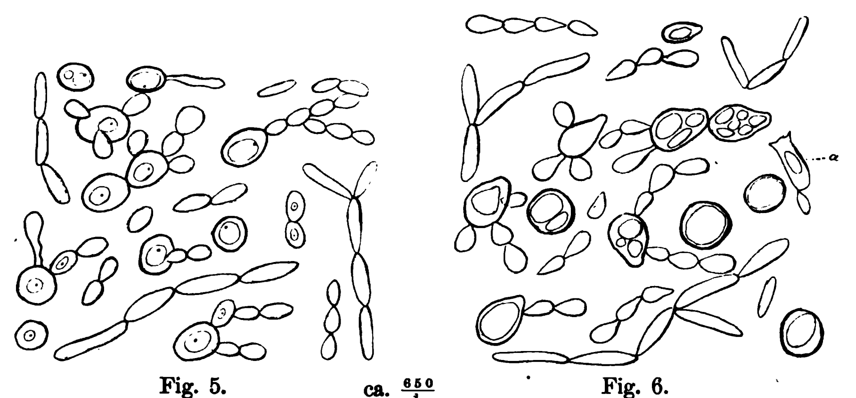
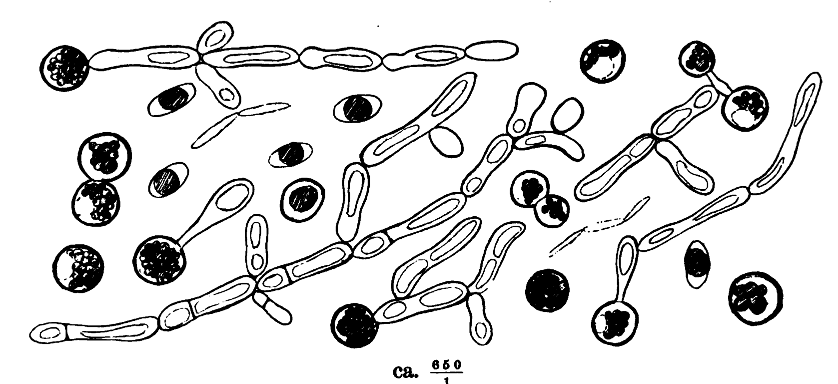


Fig. 5. ca. $\frac{650}{1}$ Fig. 6.

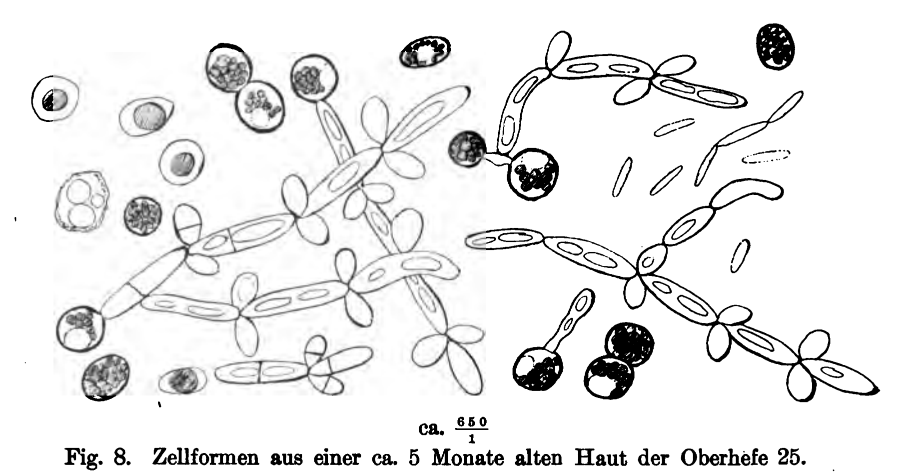
Fig. 5. Zellen der Oberhefe 25 aus einer jungen Kahmhaut bei 25°; wie bei Fig. 4.

Fig. 6. Zellen der Oberhefe 170 aus einer jungen Kahmhaut bei 25°; wie bei Fig. 4.



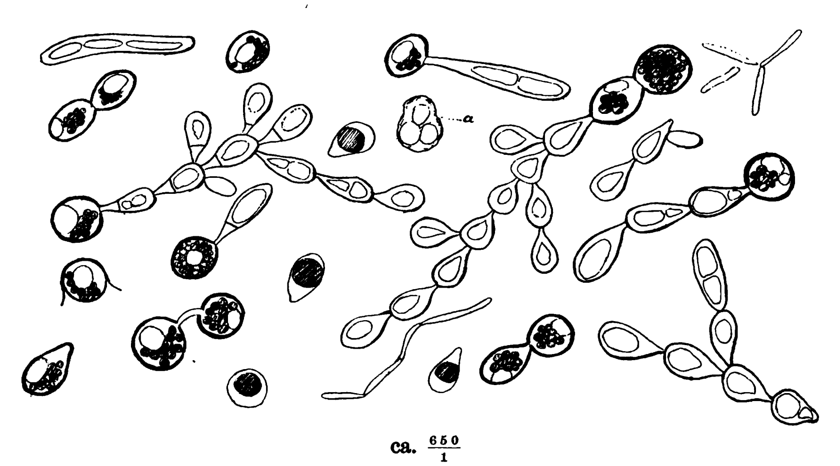
ca. $\frac{650}{1}$

Fig. 7. Zellformen aus einer ca. 5 Monate alten Haut von Oberhefe Rio. (Die Zellen mit dicker Membran sind mit Oeltröpfchen erfüllte Dauerzellen.)



ca. $\frac{650}{1}$

Fig. 8. Zellformen aus einer ca. 5 Monate alten Haut der Oberhefe 25.



ca. $\frac{650}{1}$

Fig. 9. Zellformen aus einer ca. 5 Monate alten Haut von Oberhefe 170. (Eine Dauerzelle mit teilweise abgelöster Hautschicht.)

Die Zeichnungen der Fig. 1—9 sind nach Skizzen entworfen, welche nach der Natur mit einem Zeiss'schen Zeichnenprisma erhalten wurden.

analoge Bildungen aufgefaßt und als Dauerzellen bezeichnet worden. W. Henneberg[1]) hat zwar bei den von ihm untersuchten obergärigen Hefen (Brennereihefen Rasse II und XII) mit den Dauerzellen der untergärigen Bierhefen völlig übereinstimmende Reservezellen bis jetzt nicht finden können, jedoch sind die von ihm erwähnten, in allen Heferingen und Häuten auf vergorenen Flüssigkeiten vorhandenen rundlichen Zellen mit dünnen Zellwänden und vielen Eiweißkörnchen und Fetttröpfchen sehr wahrscheinlich als „Dauerzellen" aufzufassen. Schon von Will ist darauf hingewiesen worden (l. c.), daß die von ihm als „Dauerzellen„ bezeichneten Zellelemente bei verschiedenen Hefen in verschiedener Weise abgestufte Ausbildung zeigen (vergl. Stamm 7 der von ihm untersuchten untergärigen Arten von Bierhefe). Funktionell kommen diese Zellen den Dauerzellen gleich, weichen jedoch in morphologischer Beziehung von diesen in verschiedener Hinsicht ab. Bei den drei obergärigen Bierhefen Rio, 25 und 170 erwiesen sich die als Dauerzellen angesprochenen Elemente der Haut bezw. des Heferinges den Dauerzellen der untergärigen Hefen vollständig gleichwertig, sowohl hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer morphologischen Eigenschaften als auch insbesondere hinsichtlich der Eigenart der Sprossung, die sie auch als Ausgangselemente für die 2. Generation der Hautzellen kennzeichnet. Dies soll im folgenden gleichzeitig für die drei untersuchten Oberhefen in Kürze nachgewiesen werden. Ferner sollen dann die Unterschiede zwischen den drei Hefen hinsichtlich der Entwickelung der Dauerzellen und der aus diesen entstehenden Zellformen dargelegt und endlich eine kurze Uebersicht über die hauptsächlichsten Abweichungen gegeben werden, welche die drei obergärigen Hefen bezüglich der Hautbildung unter sich und gegenüber den untergärigen Bierhefen erkennen lassen.

Was zunächst das Vorkommen der Dauerzellen betrifft, so ist zu konstatieren, daß sie sich bei allen drei untersuchten Oberhefen sowohl in der Haut als auch insbesondere im Hefering in reicher Anzahl finden. Es ist geradezu charakteristisch für die vorliegenden obergärigen Hefen, daß die Haut älterer Kulturen oft ausschließlich aus Dauerzellen besteht. Bereits nach 7 Wochen konnte dies bei Hefe Rio an Kulturen, welche bei Zimmertemperatur gestanden hatten, festgestellt werden, bei den beiden anderen Hefen 25 und 170 bestehen zu dieser Zeit die Häute noch größtenteils aus Hautzellen 1. Generation, und zwar sowohl aus den kleinen runden bezw. birnförmigen Zellen als auch aus langgestreckten Formen. Dauerzellen finden sich meist nur in beschränkter Anzahl, oft in Nestern beisammenliegend, und zwar bei Hefe 25 relativ häufiger als bei 170. Im Hefering dagegen sind bei allen drei Hefen typische Dauerzellen in großer Zahl anzutreffen. Hefe 170 macht insofern eine Ausnahme, als, wie bereits erwähnt, in den ersten Wochen rundliche Zellen mit verdickter Membran, aber mit großen Vakuolen und stark reduziertem Plasma ohne Oelkörperchen in der Haut vorkommen. In späteren Entwickelungsstadien treten aber auch bei Hefe 170 typische Dauerzellen auf. So ist in 3 Monate alten Kulturen die Haut bei Hefe 170 wie bei Hefe 25 relativ reich an echten Dauerzellen, wenn auch noch andere Zellformen in ziemlich großer Anzahl vorhanden sind.

Die bei den drei obergärigen Hefen besonders stark ausgeprägte Eigenschaft älterer Häute, leicht zu zerfallen und in Fetzen zu Boden

---

1) Henneberg, W., Abnorme Zellformen bei Kulturhefen. (Wochenschrift für Brauerei. 1904. p. 563.)

zu sinken, mag wohl die Ursache sein, daß in sämtlichen über 3 Monate alten Kulturen die Haut nur relativ wenig Dauerzellen enthält. Besonders arm an Dauerzellen waren die Stellen der Haut, welche sich durch ihre mattgraue Farbe und durch das Auftreten zahlreicher Hautzellen 1. Generation als Neubildungen charakterisierten. Dies war sowohl bei 8 Monate alten Kulturen im Laboratorium als auch bei Kulturen, die über 1 Jahr bei Kellertemperatur (ca. 10°) gestanden hatten, zu konstatieren. Der Hefering dagegen, der besonders bei den Stämmen Rio und 170 bis zu einer Dicke von 3 mm angewachsen und infolge der Verdunstung der Bierwürze einige Millimeter von dieser entfernt war, bestand ausschließlich aus Dauerzellen. Hier möge noch darauf hingewiesen werden, daß bei der Festlegung der Sporenkurve für Hefe 170 wiederholt die Beobachtung gemacht werden konnte, daß in den Gipsblockkulturen dieser Hefe nach längerem Stehen Zellen mit verdickter Membran vorgefunden wurden, welche bezüglich ihres Gehaltes an Oelkörperchen den in Haut und Hefering auftretenden Dauerzellen sehr ähnlich waren. Die gleiche Beobachtung wurde übrigens auch von Will[1]) angegeben.

Hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften unterscheiden sich die bei den drei obergärigen Hefen gefundenen Dauerzellen ebenfalls in nichts von den Dauerzellen der untergärigen Hefen. Die Zellen sind im allgemeinen 9—12 μ groß, meist rund, lediglich bei Hefe 170 kommen auch elliptische und birnförmige Dauerzellen vor. Die Membran ist wesentlich dicker als die der Bodensatzzellen, nicht selten bis zu 0,5 μ und auch etwas darüber. Eine Schichtung der Membran konnte bei den Dauerzellen in den Häuten bezw. Heferingen direkt nicht beobachtet werden; dagegen trennte sich oft bei Behandlung dieser Zellen mit konzentrierter Salzsäure eine äußere Schicht von der Zellhaut ab. Daß diese Ablösung einer äußeren Schicht auch spontan, ebenso wie bei den untergärigen Bierhefen, vorkommt, beweisen Beobachtungen, welche an Dauerzellen aus der Oberfläche einer Riesenkolonie der Hefe 170 gemacht wurden. Häufig sitzen zwei zusammenhängende Dauerzellen (Mutter- und Tochterzelle) einander anscheinend mit sehr breiter Basis auf. Die Membran ist an dieser Stelle im Gegensatz zu den übrigen Partieen derselben sehr dünn. Auch nach der Trennung dieser Zellen tritt, soweit die Beobachtungen reichen, zunächst keine Verdickung dieser dünnen Stelle ein, so daß in der dicken Umhüllung der Dauerzellen gewissermaßen eine dünne Scheibe, die wohl in besonderem Maße zum Austausch der Nährstoffe geeignet erscheint, erhalten bleibt. Auch die Keimung der Dauerzellen mit sehr stark verdickter Membran beginnt an dieser Stelle.

Der Inhalt der Dauerzellen besteht auch bei den drei obergärigen Hefen aus einer mehr oder minder reichen Zahl von stark lichtbrechenden runden Oeltröpfchen[2]), die bei den Hefen Rio und 25 oft den ganzen Zellraum ausfüllen, während bei Hefe 170 auch kleinere oder größere Vakuolen nicht selten sind. Diese Tröpfchen geben alle die für die Fettsubstanzen charakteristischen Reaktionen. Mit 1-proz. Ueberosmiumsäure färben sie sich braunschwarz, mit Alkannatinktur tritt jedoch erst dann Rotfärbung ein, wenn die Zellen durch Alkohol u. dergl. getötet sind. Ihre Löslichkeit in Alkohol, Aether, Chloroform und Schwefelkohlenstoff

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1894. p. 214. Anm.)

2) Siehe Abschnitt II. p. 12.

ist gering, solange sie sich innerhalb der Zellen befinden. Selbst Alkohol von 50—60° vermochte nach halbstündiger Einwirkung nur wenig von diesen Oeltröpfchen zu lösen; längere Behandlung mit warmer 10-proz. Kalilauge konnten sie jedoch nicht widerstehen. Die Widerstandsfähigkeit dieser Oeltröpfchen gegen obengenannte Lösungsmittel ist wesentlich geringer, wenn sie durch Druck auf das Deckglas aus den toten Dauerzellen befreit werden. Die Gegenwart einer hautartigen Hülle mit oder ohne diese durchsetzenden Maschen um die Oeltröpfchen, wie sie Will bei seinen untergärigen Hefen beobachtet hat, konnte bis jetzt bei den vorliegenden Hefen nicht beobachtet werden. Obwohl nun auch bei den Dauerzellen der obergärigen Hefen die für Eiweißsubstanzen charakteristischen Färbungen mit Jod und mit konzentrierter Salpetersäure und Ammoniak (Xanthoproteinreaktion) an den Oeltröpfchen außerhalb der Zelle auftreten und somit wenigstens auf die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer eiweißartigen Hülle schließen lassen, so müssen doch hierüber noch weitere systematische Untersuchungen vorgenommen werden. Vorläufig soll also die Bezeichnung „Oeltröpfchen" beibehalten werden. Besonders charakteristisch ist das Verhalten dieser Oeltröpfchen gegen konzentrierte Schwefelsäure, das Will als besonderes Kennzeichen für die Oeltröpfchen der Dauerzellen und überhaupt der Hautzellen angibt. Bei Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure färben sie sich anfänglich hellgrün, diese Farbung wird mit der Länge der Einwirkung immer intensiver, so daß sie zuletzt von einem schönen Stahlgrün in ein dunkles Schwarzgrün übergeht. Es ist also auch das Auftreten dieser Oeltröpfchen und ihr Verhalten gegen verschiedene Reagentien ein weiterer Beweis für die Analogie der bei den obergärigen Hefen beobachteten Zellen mit den als Dauerzellen bei den untergärigen Hefen bezeichneten Zellformen.

Die Größe der Oeltröpfchen in den Dauerzellen war je nach der Zahl verschieden. In einer über 1 Jahr alten Gelatine-(Oberflächen-) Kultur bestand z. B. der Belag bei Oberhefe Rio fast vollständig aus echten Dauerzellen, die einen einzigen großen Oeltropfen von ca. 5 μ Durchmesser enthielten. Diese Zellen waren noch lebend und zeigten im hängenden Tropfen die für Dauerzellen charakteristischen Erscheinungen bei der Sprossung. Im übrigen war das Vorhandensein eines einzigen großen Oeltropfens meist ein Zeichen, daß die Zellen bereits abgestorben waren; bei diesen Oeltropfen ließen sich auch durch Druck auf das Deckglas die von Will[1]) beschriebenen kreuz- und sternförmigen Zerreißungsfiguren hervorbringen.

Bezüglich des Glykogengehaltes, der bei den Dauerzellen der untergärigen Hefen, ihrer Funktion als Reservezellen entsprechend, im allgemeinen ein ziemlich reicher ist, konnte bei den Dauerzellen der obergärigen Hefen nur in selteneren Fällen, so vor allem in Dauerzellen, die bei der Kultur auf festem Nährboden beobachtet wurden, eine deutliche Reaktion mit Jod erhalten werden. In der Regel färben sich die Dauerzellen der Haut und des Heferinges gelb bis gelbbraun auf Zusatz von Jod. Ob bei den Dauerzellen der obergärigen Hefen überhaupt kein Glykogen aufgespeichert wird, läßt sich noch nicht übersehen, dazu bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Henneberg[2]) hat glykogen-

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 289.)

2) Henneberg, W., Ueber das Vorkommen von Glykogen bei Brennereihefen, Preßhefen und obergärigeu Brauereihefen. (Zeitschrift für Spiritusindustrie. 1902. p. 420.)

haltige Reservezellen bei Brennereihefen, Preßhefen und obergärigen Brauereihefen nicht beobachtet. Uebrigens hat auch schon Will[1]) darauf hingewiesen, daß in Beziehung auf die Speicherung von Glykogen auch bei den Dauerzellen der untergärigen Hefen Ausnahmen vorkommen.

Als dritter Beweis für das Auftreten echter Dauerzellen bei den drei obergärigen Bierhefen ist die typische Art der Sprossung anzuführen. Die Dauerzellen der Oberhefen fungieren, wie bereits erwähnt, ebenso wie bei den untergärigen Hefen als Mutterzellen für ein weiteres charakteristisches Zellelement in der Entwickelung der Kahmhaut für Hautzellen 2. Generation. Nach Verlauf von 5—6 Monaten sind bei den drei obergärigen Hefen die Hautzellen 1. Generation fast völlig aus Haut und Hefering verschwunden, wenn man von den neugebildeten Ersatzteilen für die zu Boden gesunkenen Fragmente der ursprünglichen Haut absieht. Dagegen haben sich aus einer kleineren oder größeren Zahl der vorhandenen Dauerzellen große, oft über das ganze Gesichtsfeld des Mikroskopes reichende Sproßverbände langgestreckter wurstförmiger Zellen von 15—20 μ und mehr Länge und 3—4 μ Breite entwickelt. Diese unterscheiden sich von den wurstförmigen Zellen der 1. Hautgeneration, abgesehen von den Größenverhältnissen, vor allem durch ihre ziemlich derbe Membran und durch ihr körniges Plasma, das reichlich mit kleinen Oeltröpfchen durchsetzt ist. Auch diese Oeltröpfchen zeigen die charakteristische Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure. Glykogenbildung konnte in den Hautzellen 2. Generation niemals beobachtet werden.

In einigen Sproßverbänden dieser Hautzellen konnte auch die Bildung von Querwänden, meist im unteren Drittel der Zelle, konstatiert werden. Es scheint diese Eigenschaft der Querwandbildung einzelnen Zellen eigentümlich und auf ihre Nachkommenschaft übertragbar zu sein, da sie sich nur in einzelnen Sproßverbänden, bei diesen jedoch fast in allen Zellen vorfand (p. 28). Eine besondere Form der Sprossung, welche von Will[2]) für seine vier untergärigen Hefen zum ersten Male beschrieben wurde, konnte auch bei den als Dauerzellen bei den drei obergärigen Hefen gedeuteten Zellen beobachtet werden. Bei Dauerzellen, welche einander mit breiter Basis aufsitzen, kann, wie schon bemerkt, nur an der dünnen Verbindungsstelle ein Auskeimen erfolgen. Bei isolierten, aber ursprünglich mit einer zweiten Zelle verbunden gewesenen Dauerzellen kann dies häufig beobachtet werden. Sind nun zwei Dauerzellen noch miteinander verbunden, so erfolgt das Auskeimen derart, daß an dieser dünnen Stelle der Membran eine kurze, schlauchförmige, zartwandige Zelle entsteht, welche sich zwischen den beiden Dauerzellen einschiebt und diese trennt. Es entsteht so eine Form, welche mit der einer Hantel eine gewisse Aehnlichkeit besitzt (p. 28, Fig. 3)[3].) An dem so entstandenen Keimschlauch kann dann die ungehinderte Entwickelung von typischen Zellen der 2. Hautgeneration erfolgen. Allerdings ist diese Art der Sprossung bei den zahlreichen Kulturen der drei obergärigen Hefen, die zur Beobachtung kamen, nur in einigen wenigen Fällen konstatiert worden.

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 241. Anm. u. p. 298.)

2) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. p. 314.)

3) Vergl. Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1895. Tafel VI, Fig. 9.

Aus allen diesen Beobachtungen ist der Schluß zu ziehen, daß wie bei den untergärigen, so auch bei den drei obergärigen Bierhefen typische Dauerzellen zur Ausbildung gelangen und ein sehr wichtiges Element in der Entwickelung der Haut darstellen.

Auffallende Unterschiede in der Form der Dauerzellen bestehen für die Hefen Rio und 25 nicht; bei Hefe 170 ist manchmal, wie schon erwähnt, die Gestalt der Dauerzellen nicht gleichmäßig rund, sondern auch birnförmig und elliptisch.

Auch hinsichtlich der Gestalt der Hautzellen 2. Generation stehen sich Hefe Rio und Hefe 25 sehr nahe. Die Zellen sind im allgemeinen 15—20 μ, oft aber auch bis zu 30 μ lang und 3—4 μ breit. Häufig sind diese Zellen bei Hefe Rio am oberen Ende etwas breiter als am unteren und gegen die Mitte zu etwas eingeschnürt. An dieser Stelle finden sich dann auch Querwände. Die äußeren Glieder der reichverzweigten Sproßverbände zeigen bisweilen etwas gekrümmte „bohnenähnliche" Form. Nicht selten entstehen an den langgestreckten großen Zellen durch seitliche oder polare Sprossung kleine ovale Zellen von 6—7 μ Länge und ca. 4 μ Breite, mit derber Membran und dichtem, von zahlreichen kleinen Oeltröpfchen durchsetztem Plasma (p. 28, Fig 1). Die Hautzellen 2. Generation der Oberhefe 25 besitzen im allgemeinen ähnliche Formen und Größenverhältnisse wie bei Hefe Rio. Sie sind meist wurstförmig, doch kommt auch die oben erwähnte Bohnenform nicht selten vor. Auch kleinere ovale Zellen sind an den Sproßverbänden vorhanden; sie sprossen meist an den Polen der langgestreckten Zellen und zwar gleichmäßig auf beiden Seiten hervor und verleihen so den Sproßverbänden der Hautzellen 2. Generation der Hefe 25 eine gewisse Regelmäßigkeit, an der sie, wenigstens in vielen Fällen, nicht unschwer zu erkennen sind (p. 28, Fig. 2). Bei Oberhefe 170 bestehen die Sproßverbände der Hautzellen 2. Generation aus charakteristischen keulen- und birnförmigen, 12—15 μ langen Zellen, die oft prächtige, weitverzweigte Sproßverbände bilden. Wurstförmige Zellen sind relativ selten (p. 28, Fig. 3).

Auch hinsichtlich der zeitlichen Entwickelung der Hautzellen 2. Generation bilden die Oberhefen Rio und 25 eine Gruppe, ebenso wie bei der Entwickelung der Hautzellen 1. Generation. Bei Hefe 25 ist indessen die Neigung zur Entwickelung der ersteren geringer als bei Hefe Rio; Oberhefe 170 zeigt am wenigsten und spätesten die Eigenschaft, typische Zellen und Sproßverbände der Hautzellen 2. Generation zu bilden.

Nach 3 Monaten enthielt die gut entwickelte Haut einer bei Zimmertemperatur stehenden Kultur der Oberhefe Rio fast ausschließlich Dauerzellen, nur an einigen, durch ihre weißgraue Färbung als Neubildungen kenntlichen Stellen der Haut traten auch die Hautzellen der 1. Generation auf. Aus einzelnen dieser Dauerzellen waren bereits 15—25 μ lange, schlauchförmige Zellen hervorgesproßt, die auch nach der Derbheit der Membran und der Beschaffenheit des Plasmas als Hautzellen 2. Generation anzusprechen waren. Größere Sproßverbände solcher Zellen fanden sich jedoch noch nicht vor. Der kräftig entwickelte Hefering bestand fast ausschließlich aus Dauerzellen, jedoch waren namentlich an der Oberfläche des Ringes nicht selten große Sproßverbände von Hautzellen 2. Generation vorhanden.

Oberhefe 25 hatte nach 3 Monaten wohl eine kräftige Haut gebildet, der Hefering bestand jedoch nur aus einzelnen schwach ent-

wickelten Fragmenten. Die Haut enthielt noch zahlreiche Zellen der 1. Hautgeneration; Dauerzellen waren häufig vorhanden und lagen meist in Nestern beisammen. Unzweifelhafte Hautzellen 2. Generation konnten nicht beobachtet werden, nur im Hefering, der im übrigen fast ganz aus Dauerzellen bestand, sproßten aus einigen derselben kurze Verbände wurstförmiger Zellen mit derber Membran oder einzelne schlauchförmige Zellen aus[1]).

Die Haut einer 3 Monate alten Kultur der Oberhefe 170, welche unter den gleichen Bedingungen, wie die vorher erwähnten Kulturen der Hefen Rio und 25 gewachsen war, bestand im wesentlichen aus Zellen der 1. Hautgeneration, daneben auch aus den für Hefe 170 charakteristischen Zellen mit weniger verdickter Membran und reduziertem Plasma[2]) und endlich auch aus einigen typischen Dauerzellen. Der stark entwickelte Hefering bestand fast ausschließlich aus Dauerzellen, oft von deutlich elliptischer und birnförmiger Gestalt, Hautzellen 2. Generation waren jedoch nicht vorhanden. Auch in diesem Punkte stimmt also Oberhefe 170 mit der untergärigen Bierhefe, Stamm 7 von Will[3]), überein.

Nach 5 Monaten hatte sich bei Hefe Rio und Hefe 25 das Bild noch wenig geändert. Nur war bei Stamm Rio die anfänglich sehr starke Haut schon vielfach zu Boden gesunken, ohne daß eine Ausfüllung der Lücken durch neugebildete Elemente stattgefunden hätte. Die Haut sowohl als ihre als helle Fetzen sich deutlich vom braunen ursprünglichen Bodensatz abhebenden zu Boden gesunkenen Fragmente bestehen größtenteils aus Dauerzellen, zwischen denen sich die oft sehr langen Sproßverbände der Hautzellen 2. Generation befinden. Der Hefering ist sehr stark und gleichmäßig entwickelt und hängt so fest in sich zusammen, daß beim Versuche, mit der Platinöse ein Präparat zu entnehmen, lange zusammenhängende Stücke abreißen. Er besteht aus echten Dauerzellen, die Außenseite ist jedoch — ebenso wie bei den untergärigen Hefen — mit einem dichten Flechtwerk von Sproßverbänden der Hautzellen 2. Generation überzogen.

Auch bei Oberhefe 25 war die Haut nach 5 Monaten teilweise zu Boden gesunken. Die Hautfragmente enthielten zahlreiche Dauerzellen, seltener auch Sproßverbände von Hautzellen 2. Generation. Der Ring war schwach entwickelt und bestand aus Dauerzellen, die vereinzelt zu typischen Zellen der 2. Hautgeneration ausgesproßt waren.

Oberhefe 170 zeigte nach 5 Monaten eine ziemlich stark entwickelte Haut, die aus typischen Dauerzellen und prächtigen Sproßverbänden birn- und keulenförmiger Zellen bestand. Im spärlich entwickelten Hefering waren ausschließlich Dauerzellen vorhanden.

Besonderes Interesse boten Kulturen, welche in doppelter Ausführung über 10 Monate bei Zimmertemperatur ohne jede Erschütterung gestanden hatten.

Die Kulturen der Hefe Rio enthielten keine Spur mehr von Hautbildung. Auf dem braunen ursprünglichen Bodensatz hoben sich die

---

1) Bei Hefe Rio und Hefe 25 konnten im Hefering von 3 Monate alten Kulturen einige zartwandigen, runde und gestreckte Zellen von der Größe der Bodensatzzellen beobachtet werden, welche zwei bis drei Sporen enthielten. Siehe auch H. Will, Vergleichende Untersuchungen etc. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1895. p. 265 und 1904. p. 607, Anm.).

2) Siehe Hautbildung. A. p. 26.

3) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1895. p. 44.)

gelbweißen Fragmente der zu Boden gesunkenen Oberflächenhaut deutlich ab. Vom Bodensatz hatte sich, an der Wand des Erlenmeyer-Kölbchens aufsteigend, ein fast bis an den sehr stark entwickelten Hefering reichender Wandbelag gebildet. Der Ring bestand ausschließlich aus Dauerzellen; wurstförmige Hautzellen 2. Generation waren in diesen Kulturen im Ring selten. Die auf dem Bodensatz liegenden Hautfetzen waren aus Dauerzellen und einem eng verflochtenen Netzwerk reich entwickelter Sproßverbände von wurstförmigen Hautzellen 2. Generation gebildet. Im Wandbelag sind letztere nicht vorhanden, auch wenig typische Dauerzellen, dagegen viele Rundzellen, welche etwas kleiner sind als Dauerzellen und bei allen sonstigen Merkmalen derselben eine schwächere Membran besitzen. Daneben kommen glykogenhaltige, ovale Zellen der 1. Hautgeneration, oft in kurzen Sproßverbänden vor und häufig wurst- und stabförmige dünne Zellen von ca. 7 μ Länge, welche homogenes, wenig lichtbrechendes Plasma und eine kaum sichtbare Membran besitzen. Aehnliche Zellen hat auch Henneberg[1]) beobachtet. Sie kommen übrigens auch in den auf alten Kulturen neugebildeten Hautflecken vor; sehr wahrscheinlich handelt es sich auch im vorliegenden Fall um pathologische Erscheinungen.

Oberhefe 25 zeigte nach 10 Monaten nur noch einige teils braungelbe, teils gelbgraue Hautfragmente. Letztere sind durch das Auftreten von Hautzellen 1. Generation und von den oben erwähnten stabförmigen dünnen Zellen als Neubildungen zu erkennen. Die braungelben Flecke enthalten wieder typische Dauerzellen und große Sproßverbände von Hautzellen 2. Generation. Der sehr schwach entwickelte Hefering enthält nur Dauerzellen, viele davon mit abgelöster Hautschicht und zusammengeflossenen Oeltröpfchen. Daneben sind vereinzelt Riesenzellen und schlauchförmige Zellen zu beobachten. Wandbelag ist nicht vorhanden.

Die Kulturen der Oberhefe 170 weisen nach 10 Monaten ebenfalls nur noch einzelne, teilweise neugebildete Hautfragmente auf. Diese sind oft von prächtigen Sproßverbänden birnförmiger Hautzellen 2. Generation durchzogen. Aehnlich sind auch die hellen Hautfetzen über dem Bodensatz zusammengesetzt, doch sind auch noch viele Dauerzellen und stabähnliche dünne Zellen vorhanden. Der Hefering ist ungleichmäßig, bald stärker, bald schwächer ausgebildet und enthält viele, nicht selten tote Dauerzellen und eigenartig deformierte tote und in Auflösung begriffene Riesenzellen, deren Membran verzogen und gekräuselt erscheint (p. 28, Fig. 3a). Hautzellen 2. Generation sind nicht vorhanden.

Auch bei Kulturen, die über 1 Jahr aufbewahrt worden waren, sind diese Verhältnisse bei allen drei obergärigen Hefen so ziemlich gleich geblieben.

In sämtlichen älteren Kulturen war also die in den ersten Monaten gebildete starke Haut ohne besonderen äußeren Anlaß zu Boden gesunken. Bei der Oberhefe Rio war ein Ersatz durch Neubildungen nicht oder doch nur in sehr beschränktem Maße erfolgt. Dagegen war der Hefering durchweg sehr stark und gleichmäßig entwickelt und oft von einem Flechtwerk von Sproßverbänden der 2. Hautgeneration überzogen. Dieses fast regelmäßige Fehlen einer Haut und die starke und gleichmäßige Ausbildung des Heferinges ließ ältere Kulturen der Hefe Rio deutlich von gleichaltrigen Kulturen der Hefen 25 und 170 unter-

1) Henneberg, W., Abnorme Zellformen bei Kulturhefen. (Wochenschr. f. Brauerei. 1904. p. 566.)

scheiden. In Beziehung auf das Verhalten in älteren Hautkulturen steht also Oberhefe Rio dem untergärigen Bierhefestamm 93 von Will nahe. Oberhefe 25 nimmt gewissermaßen eine Mittelstellung zwischen den Hefen Rio und 170 ein. In älteren Hautkulturen ist sie vor allem durch die sehr spärliche Ausbildung des Heferinges und durch die schon erwähnte Regelmäßigkeit der Sproßverbände der 2. Hautgeneration kenntlich. Oberhefe 170 endlich zeichnet sich durch eine ungleichmäßige Entwickelung des Heferinges, vor allem aber durch die späte Bildung typischer Dauerzellen und das Fehlen von Verbänden der langgestreckten Hautzellen 2. Generation an der Oberfläche des Heferinges aus. Hierdurch ist, wie schon erwähnt, Oberhefe 170 der untergärigen Bierhefe 7 von Will ähnlich.

Im großen und ganzen können bezüglich der Hautbildung Oberhefe Rio und Oberhefe 25 zu einer Gruppe vereinigt und der Oberhefe 170 gegenüber gestellt werden. Besonders charakteristische Unterschiede für Hefe 170 sind die späte Ausbildung der Dauerzellen, der geringe Umfang, in welchem Hautzellen 2. Generation, die auf der Oberfläche des Heferinges überhaupt fehlen, ausgebildet werden und auch die vorwiegend birn- und keulenförmige Gestalt der Hautzellen 2. Generation.

Ein fundamentaler Unterschied in der Entwickelung der Hautbildung zwischen obergärigen und untergärigen Bierhefen besteht nicht. Es treten alle diejenigen Zellelemente in zwei Hauptphasen im Entwickelungskreis der Kahmhäute auf, wie sie von Will für die untergärigen Hefen aufgestellt wurden, also die zartwandigen glykogenhaltigen Zellen der 1. Hautgeneration, die als Chlamydosporen aufzufassenden, reichlich mit Fett versehenen Dauerzellen und endlich die aus diesen stammenden langgestreckten Hautzellen 2. Generation. Als eine spezielle Eigenschaft der drei obergärigen Hefen, welche diese gegenüber den untergärigen Bierhefen kennzeichnet, kann also lediglich die intensivere und frühzeitigere Entwickelung der Kahmhaut, die sich jedoch aus den spezifischen Erscheinungen des Gärungsverlaufes bei den obergärigen Hefen erklärt, bezeichnet werden.

Nach den bisherigen Untersuchungen bilden größere Intensität und rascherer Verlauf sowohl bei der Gärung als auch bei der Sporen- und Hautbildung eines der hauptsächlichsten Kriterien für die Diagnostizierung einer obergärigen Bierhefe gegenüber einer untergärigen.

V. Wachstumform auf festem Nährboden.

Für alle, welche sich eingehender mit den Wachstumserscheinungen der Saccharomyceten und anderer Sproßpilze auf festen Nährböden beschäftigt haben, unterliegt es keinem Zweifel mehr, daß von diesen recht wertvolle Merkmale für die Unterscheidung der einzelnen Arten und von Gruppen solcher abgeleitet werden können. Bei einer Beschreibung und vergleichenden Untersuchung von Hefen dürfen daher Angaben über die Wachstumform in Einzell- wie in Riesenkolonieen nicht mehr fehlen.

Will gelangte auf Grund seiner vergleichenden Untersuchungen an vier untergärigen Bierhefen zu dem Schluß, daß die Riesenkolonieen auf festem und die Hautbildungen auf flüssigem Nährsubstrat gleichwertig, identisch sind. Es war daher von um so größerem Wert, die

Riesenkolonieen der vorliegenden drei obergärigen Bierhefen zu studieren, um feststellen zu können, ob auch hier die gleichen Beziehungen zwischen diesen Kolonieen und den Hautbildungen wie bei den untergärigen Hefen bestehen. Ferner mußte auch untersucht werden, ob der anatomische Bau der Riesenkolonieen die gleiche Gesetzmäßigkeit zeigt, wie sie Will für seine vier untergärigen Bierhefen nachgewiesen hat.

Bei einer je größeren Anzahl von Hefearten die Wachstumform auf festen Nährböden, insbesondere diejenige der Riesenkolonieen, mit den übrigen, die Arten charakterisierenden Merkmalen bekannt werden, desto eher werden sich aber auch wohl allgemeinere Gesichtspunkte für eine weitere Bewertung derselben für die Charakterisierung der Hefen gewinnen lassen.

Die ausgedehntere Verwendung der Wachstumserscheinungen auf festen Nährböden zur Charakterisierung der Saccharomyces-Arten ist erst in neuerer Zeit mehr zur Würdigung gekommen. Hansen[1]) war der erste, welcher einige kurze Angaben über die Wachstumsform der Saccharomyceten und anderer Sproßpilze auf festen Nährböden gemacht hat. Später finden sich in der Literatur bei Beschreibungen von Hefen und anderer Sproßpilzarten ebenfalls vereinzelte, teilweise ziemlich unzulängliche Angaben über Wachstumserscheinungen auf festem Nährsubstrat. Größere Bedeutung erlangten die Wachstumserscheinungen der Hefen auf festen Nährböden erst durch die von Lindner[2]) zuerst gezüchteten „Riesenkolonieen“, die aus einem auf ein festes Nährsubstrat aufgetragenen Tröpfchen Hefe sich entwickeln. Auch die Bedeutung der Riesenkolonieen für die Diagnose der Hefen hat Lindner voll gewürdigt. Später hat R. Aderhold[3]) den Riesenkolonieen der von ihm untersuchten Saccharomyces ellipsoideus-Arten seine Aufmerksamkeit zugewendet und schon darauf hingewiesen, daß in vielen Punkten das Wachstum der Hefen in den Riesenkolonieen dem in den Häuten ähnlich ist. Erst die Untersuchungen von Will[4]) ermöglichten aber einen genauen Einblick in die Gesetzmäßigkeit der Entwickelung der Kulturen auf festem Nährsubstrat und wiesen die Identität der im Verlaufe der Hautentwickelung auftretenden Zellgenerationen mit den in den aufeinanderfolgenden Entwickelungsstadien der Riesenkolonieen auftretenden Zellformen nach. Die Willschen Arbeiten führten erst zu dem richtigen Verständnis der anscheinend so verwickelten und doch wiederum so einfachen und regelmäßig bei allen Hefen wiederkehrenden Vorgänge bei der Entwickelung der Hautbildung und der Riesenkolonieen.

Von den zahlreichen festen Nährböden, welche von den genannten Forschern in Anwendung gebracht wurden, erschien für den vorliegenden Zweck die reine, ohne alle chemischen Zusätze hergestellte Würzegelatine als der geeignetste, da diese in allen zymotechnischen Laboratorien gebräuchlich und die gleichzeitige Herstellung einer größeren Menge leicht

---

1) Hansen, E. Chr., Untersuchungen über die Physiologie und Morphologie der Alkoholfermente. (Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen. 1886. p. 297) und „Ueber Hefe und Hefereinzucht“. (Centralblatt f. Bakt. u. Parasitenk. Bd. II. 1887. p. 118.)

2) Lindner, P., Ueber die Erkennung der Heferassen und ihre photographische Darstellung. (Wochenschrift f. Brauerei. 1891. p. 815.) Das Wachstum der Hefen auf festen Nährböden. (Ibid. 1893. p. 692.)

3) Aderhold, R., Die Morphologie der deutschen Saccharomyces ellipsoideus-Arten. (Landwirtschaftliche Jahrbücher. Bd. XXIII. 1894. p. 615.)

4) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen. 1898. p. 443 ff.)

möglich ist. Gerade aber das Vorhandensein einer größeren Menge der gleichen Würzegelatine ist für längere Zeit in Anspruch nehmende Versuche, wie die vorliegenden, von besonderem Wert, weil dadurch alle Komplikationen, die durch Aenderungen in der chemischen und physikalischen Beschaffenheit des festen Nährsubstrates nach den Untersuchungen Wills herbeigeführt werden können, wenn sonst geeignete Maßregeln getroffen werden, vermieden werden können. Daß solche Beeinflussungen durch Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Würze und der Konsistenz der Gelatine eintreten, wurde im Verlauf dieser Untersuchungen zu wiederholten Malen festgestellt.

Für die Hauptreihe der im folgenden dargelegten Untersuchungen wurde eine Würzegelatine gewählt, welche aus 10 Teilen reinster Gelatine auf 90 Teile ca. 14-proz. Braunbierwürze bestand und nach der Sterilisation im strömenden Wasserdampf noch etwa 2 Wochen unter Watteverschluß aufbewahrt wurde, ehe sie in Verwendung kam.

A.
Das Wachstum der Zellen der Alkoholgärungsform in Einzellkolonieen.

Das Studium der Wachstumsform von Hefen auf festem Nährboden scheidet sich in zwei natürliche Teile, ins Studium der Entwickelung von Einzellkolonieen und in das der Riesenkolonieen. Bezüglich der Form, welche die aus einer einzigen isolierten Zelle entstandene Hefekolonie annehmen kann, hat Will drei „Typen“ aufgestellt. Als Typus I bezeichnet er solche Kolonieen, welche eine regelmäßige Linsen-, Kugel-, Halbkugel- oder Zapfenform besitzen. Die Peripherie dieser regelmäßigen Kolonieen zeigt nur diejenigen Unebenheiten, wie sie durch die Aneinanderlagerung der rundlichen und ovoidischen Hefezellen bedingt sind. Den Typus II bilden unregelmäßige Kolonieen mit regelmäßigem Kern. Ueber den Rand des letzteren ragen größere oder kleinere Sproßverbände hinaus, bald in geringerer Zahl aus einer Stelle der Peripherie des regelmäßigen Kernes hervorspringend, bald von mehreren Stellen derselben strahlenförmig ausgehend, bald einen Kranz langgestreckter Sproßverbände um den dichteren Kern bildend [1]). Für den Fall, daß ein größeres Bündel von Sproßverbänden die Peripherie des dichten Kernes an einer Stelle durchbricht, gebraucht Will den Vergleich mit einer „platzenden Bombe“, für den Fall, daß die Sproßverbände an mehreren Stellen hervordringen, den Ausdruck „Polypenform“. Als Typus III wird die vollständig unregelmäßige Form der Kolonieen bezeichnet, bei der schon von der Mutterzelle aus nach allen Seiten unregelmäßige Sproßverbände ausstrahlen. Im Gegensatz zum 1. Wachstumstypus, bei dem die Sproßverbände nicht erhalten bleiben, sind die einzelnen Glieder der Sproßverbände bei Typus III in ziemlich festem Zusammenhang untereinander [2]).

Da das Wachstum der Einzellkolonieen nicht nur durch Verschiedenheiten des festen Nährsubstrates, sondern auch durch die Zusammensetzung der Nährlösung, in welcher sich die Zelle vor der Einsaat in dieses befand, die Temperatur, die Lüftung, die Dicke der Gelatineschicht und auch in gewisser Beziehung durch den Feuchtigkeits-

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen. 1898. Taf. I. Fig. 2.)
2) Will, H., ibid. 1895. p. 3 und 1898. p. 446.

grad der Luft in den feuchten Kammern beeinflußt wird, mußten für die Beobachtung der Wachstumserscheinungen möglichst einheitliche Versuchsbedingungen gewählt werden. Zunächst wurden die drei obergärigen Hefen längere Zeit in der gleichen Braunbierwürze bei 25° gezüchtet, wobei sie alle 3—4 Tage in frische Würze übergeführt wurden. Einige Tage vor Anlage der Kulturen in den feuchten Kammern wurden die drei Hefen alle 24 Stunden übergeimpft, um ja das Aufkommen von Kahmhautzellen, deren Wachstumstypus in Einzellkolonieen nach den Untersuchungen von Will meist verschieden von demjenigen der Bodensatzzellen der Alkoholgärungsform ist, hintanzuhalten. Von diesen Kulturen wurden dann in möglichst dünner Schicht von Würzegelatine in der Böttcherschen feuchten Kammer eine Anzahl Zellen ausgesät und das Wachstum der markierten isolierten Zellen täglich beobachtet. Nach der Beobachtung wurde der Ring der feuchten Kammer vom Objektträger ca. $1/2$ Minute zur Lüftung abgehoben und event. der in der Kammer befindliche Wassertropfen erneuert. Infektion ist auf diese Art und Weise der Lüftung in keiner der beobachteten Einzellkulturen eingetreten.

Die Beobachtungen wurden bei Zimmertemperatur und zwar zu verschiedenen Zeiten, einmal im Winter in mäßig geheiztem Zimmer (circa 17—18°), das zweite Mal im Spätfrühling (Zimmerwärme 20—25°) ausgeführt. Zur Untersuchung kam im ersten Fall die 85., im zweiten Falle die 132. Ueberimpfung der drei Oberhefen. Unterschiede zwischen den Wachstumsformen der Einzellkolonieen dieser beiden zeitlich verschiedenen Beobachtungsreihen konnten nicht konstatiert werden. Zur Beobachtung der Wachstumserscheinungen der Einzellkolonieen wurden nur solche Zellen gewählt, deren äußerer Habitus sie als typische Bodensatzzellen der betreffenden Oberhefe charakterisierte.

Was nun die Wachstumsformen der unter vorstehenden Bedingungen gezüchteten Einzellkolonieen betrifft, so konnten wesentliche Unterschiede zwischen den drei obergärigen Hefearten nicht konstatiert werden. Hefe Rio und Hefe 170 besitzen beide vollständig unregelmäßige Kolonieen (Typus III), die auch nach längerer Beobachtungsdauer nur in wenigen Fällen — bei Hefe 170 vielleicht etwas häufiger — sich dem Wachstumstypus II („Polypenform") etwas nähern. Oberhefe 25 dagegen wächst in den meisten Fällen nach dem Wachstumstypus II. Es lagert sich bei dieser Hefe meist dem regelmäßigen runden Kern ein heller Kranz langer Sproßverbände an, deren einzelne Zellglieder in engem Zusammenhange bleiben, während die Zellen des dichten Kernes bald ohne Verbindung nebeneinander lagern. Völlig unregelmäßige Kolonieen kommen bei Hefe 25 nur in seltenen Fällen vor.

Der vollständig regelmäßige, auch als „Maulbeerform" bezeichnete Typus I wurde bei keiner der zahlreichen beobachteten Einzellkolonieen der drei obergärigen Bierhefen konstatiert. Da die überwiegende Mehrzahl der untergärigen Bierhefen — von den vier Hefestämmen der Willschen Arbeiten machten nur die Stämme 6 und 7 eine Ausnahme — bei Aussaat von Zellen der Alkoholgärungsform in den Einzellkolonieen den Wachstumstypus I aufweist, so scheint die Beobachtung der Wachstumserscheinungen in Einzellkolonieen im Verein mit anderen ein Merkmal zu sein für die Charakterisierung einer obergärigen Bierhefe.

Die Form der Zellen war auch in der Kultur auf festem Nährboden im allgemeinen die für die betreffende Hefe in Nährflüssigkeiten charakteristische, so daß also bei Hefe Rio kurz-elliptische, bei Hefe 25 rund-

liche und ovale und bei Hefe 170 ovoidische und birnförmige Zellen vorherrschen. Die Membran der Zellen hatte bei allen drei Hefen nach einiger Zeit eine gewisse Verdickung erfahren, das Plasma der Zellen war schaumig geworden und besaß auch einige stark glänzende Granula. Als Dauerzellen waren diese Zellen nicht aufzufassen. Eine Kultur der Hefe 170, welche längere Zeit höherer Temperatur ausgesetzt und deren Gelatine infolgedessen etwas weicher geworden war, enthielt nach zirka 14 Tagen eine große Anzahl sporenführender Zellen; besonders die Erscheinung der „Scheidewandbildung“ (stark aufgequollene Sporen) war sehr häufig.

Nach 8—10 Tagen machten sich bei sämtlichen drei Hefen einzelne Nester von kleineren Zellen bemerkbar, welche sich von den inzwischen stark vakuolisierten und granulierten Zellen der ersten Tage durch ihre dünnere Membran und ihr homogenes Plasma unterschieden. Besonders an den Ausläufern konnten diese kleinen Zellen beobachtet werden. Es wiederholen sich also hier die gleichen Erscheinungen, welche Will an den „auswachsenden“ Einzellkolonieen der untergärigen Hefen beobachtet hat und auf welche er unter anderem auch die Identität der Einzell- wie Riesenkolonieen mit den Hautbildungen gründet. Es handelt sich also jedenfalls um die Entwickelung der Hautzellen 1. Generation.

Typische Dauerzellen wurden in den Kolonieen direkt nicht beobachtet, dagegen konnte hie und da das Auftreten derselben in Proben konstatiert werden, welche zur mikroskopischen Untersuchung den Gelatinekulturen entnommen waren. Gleichzeitig mit dem Auftreten von Dauerzellen wurde aber auch die Entstehung sehr langer Sproßverbände von gestreckten Zellen beobachtet, welche nach ihrem ganzen Aussehen den Hautzellen 2. Generation gleichen. Die Zellen dieser Sproßverbände hatten im allgemeinen die der betreffenden Hefe eigentümliche Form, bei Hefe 170 kamen besonders schöne Sproßverbände birnförmiger Zellen wie in den Hautbildungen vor. Doch wurden diese Sproßverbände erst nach ca. 2 Monaten beobachtet und auch nur bei einzelnen Kolonieen. Die „ausgewachsenen“ Kolonieen der drei obergärigen Hefen zeigen also die gleichen Veränderungen wie diejenigen der untergärigen Arten, und diese Veränderungen vollziehen sich wie dort in zwei Phasen, welche durch besondere Zellformen charakterisiert sind. Bei den übrigen Kolonieen der drei Hefen waren im vorgeschrittenen Alter die strahlenförmigen Ausläufer vornehmlich aus Zellen gebildet, welche verdickte Membran und körniges Plasma besitzen, ohne jedoch den echten Dauerzellen völlig zu gleichen. Es findet also die bei den drei obergärigen Bierhefen gelegentlich der Hautbildung gemachte Beobachtung, daß dieselbe im allgemeinen wenig zur Entwickelung von Sproßverbänden der langgestreckten Hautzellen 2. Generation neigen, auch durch die bei der Enwickelung der Einzellkolonieen gemachten Erfahrungen ihre Bestätigung.

Unterschiede zwischen den drei vorliegenden obergärigen Bierhefen konnten aus den Beobachtungen über die späteren Erscheinungen an den Einzellkolonieen nicht abgeleitet werden.

B.

Die Wachstumsform der Riesenkolonieen bei Aussaat von Zellen der Alkoholgärungsform.

Zur eingehenden Charakterisierung einer Hefeart ist unter allen Umständen das Studium ihrer Wachstumsform auf festem Nährboden im großen, die von P. Lindner als „Riesenkolonie“ bezeichnet wurde,

nötig. Diese Erscheinungsform ist deshalb von so großem Wert für die Diagnose der Hefearten, weil bei einigermaßen gleichen Versuchsbedingungen die an den Riesenkolonieen zum Ausdruck kommenden Eigentümlichkeiten der einzelnen Hefen im großen und ganzen sich unverändert forterhalten und weil uns auch die leicht mögliche photographische Reproduktion der Riesenkolonieen die oft sehr charakteristischen Wachstumsformen dann noch vor Augen führen kann, wenn die Kolonieen selbst schon lange zerstört sind. Zu diesen Vorteilen für die Diagnose der Hefearten kommt aber noch das Interesse, welches die Riesenkolonie für das Verständnis der verschiedenen Erscheinungsformen der Hefezellen selbst bietet.

Als Nährsubstrat für die Anlage der Riesenkolonieen wurde aus vorher[1]) bezeichneten Gründen 10-proz. Würzegelatine gewählt. Die Würzekulturen der drei obergärigen Hefen wurden zunächst durch einige Male wiederholtes Ueberimpfen aufgefrischt; bei der mikroskopischen Untersuchung waren nur kräftig sprossende Zellen der Alkoholgärungsform zu beobachten. Zum Zwecke der besseren vergleichenden Darstellung wurde von den drei Hefen je ein Tröpfchen des Bodensatzes in ein und denselben Erlenmeyer-Kolben gebracht, der eine ca. 2 cm hohe Gelatineschicht enthielt. Es wurde also im allgemeinen nach der übrigens auch von Will[2]) bei seinen Untersuchungen befolgten Vorschrift Lindners[3]) gearbeitet. Ein Teil der Kolonieen war auch in Glasdosen, wie sie für die Herstellung von Sporenkulturen gebräuchlich sind, angelegt worden. So günstig sich dies auch für die photographische Darstellung erwies, so mußte doch infolge der großen Infektionsgefahr, die oft gerade die schönsten Kolonieen zerstörte, bald davon wieder abgesehen werden. Von den zahlreichen angelegten Riesenkolonieen wurde ein Teil bei Zimmertemperatur (17—20°), ein Teil bei Kellertemperatur (10—12°) gezüchtet, um den Einfluß der Temperatur auf die Entwickelung der Riesenkolonieen einigermaßen zu studieren. Es zeigte sich aber bei höherer Temperatur schon nach wenigen Tagen ein Hindernis für die ruhige Ausgestaltung typischer Riesenkolonieen, das auch von Lindner[4]) gerade bezüglich obergäriger Kulturhefen erwähnt wird, nämlich die lästige Auftreibung der Kolonieen durch Kohlensäureblasen. Aus diesem Grunde wurden im späteren Verlauf der Untersuchungen sämtliche Kolonieen nach ca. 8 Tagen nur bei Kellertemperatur weitergezüchtet.

Bezüglich der Entwickelung der jungen Riesenkolonieen machte sich in den ersten 24 Stunden kein Unterschied zwischen den drei obergärigen Bierhefen bemerkbar. Die Riesenkolonieen stellen runde bis ovale, grauweiße, gleichförmige Beläge dar, welche je nach der Größe des ausgesäten Hefetropfens 4—8 mm Durchmesser besitzen. Schon nach 24 Stunden macht sich indessen bei allen drei Hefen eine Einsenkung der zentralen Partie bemerkbar, so daß die Kolonieen infolgedessen das Aussehen von flachen Schalen erhalten. Der Rand der Kolonieen ist abgerundet und regelmäßig, nur in einem Falle konnte ein kleiner Riß in der Kolonie bemerkt werden, der offenbar durch die Spannung der trocken werdenden Hefemasse erzeugt worden war.

1) Siehe Abschnitt V. p. 38.
2) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1902. p. 144.)
3) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. 1901. p. 178.
4) Lindner, P., ibid. p. 179.

Die Riesenkolonieen der drei Hefen boten schon nach 24 Stunden ein wesentlich anderes Bild bezüglich Form und Größe der sie zusammensetzenden Zellen, als man nach der ausgesäten Bodensatzhefe hätte erwarten sollen. Stamm Rio enthielt in der Hauptsache noch viele Bodensatzzellen, deren Inhalt meist durch eine große Vakuole ziemlich reduziert war. Am Rande der Kolonie und auch an der Unterseite fanden sich gestreckt-ovale Zellen mit homogenem Plasma, ihr Längsdurchmesser ist etwa 12—14 μ bei einem Querdurchmesser von 3—4 μ. Daneben finden sich in ziemlicher Anzahl kleinere elliptische Zellen von 5—7 μ Längsdurchmesser, welche ebenfalls zarte Membran und homogenes Plasma besitzen. Bei der Oberhefe 170 sind diese Verhältnisse nicht wesentlich verschieden, nur zeigt sich oft die für 170 charakteristische Birn- und Keulenform. Oberhefe 25 zeigt dagegen insofern Abweichungen in der Art der Zusammensetzung, als wurstförmige Zellen noch nicht zur Ausbildung gelangt sind. Es herrschen neben den stark vakuolisierten Zellen der Aussaat vor allem kleinere 5–6 μ große ovale Zellen vor, welche homogenes Plasma und zarte Zellwände besitzen. Es liegt also bei Oberhefe 25 eine gewisse Aehnlichkeit mit dem untergärigen Stamm 7 vor, dessen Riesenkolonieen auf Würzegelatine ebenfalls nach 24·Stunden noch keine wurstförmigen Zellen besitzen. Im übrigen ist bemerkenswert, daß die in den Vakuolen der Bodensatzzellen von Oberhefe 25 bei Würzekulturen oft beobachteten Körnchen in den Riesenkolonieen selten sind und mit zunehmendem Alter derselben ganz verschwinden.

Nach 48 Stunden war die Höhe des Hefebelages der Riesenkolonieen bei den drei obergärigen Hefen etwa auf 1 mm gewachsen. Die schalenartige Einsenkung in der Mitte der Kolonieen hat sich etwas vertieft, auch die Gelatine um die Peripherie der Kolonieen ist schwach eingesenkt. Bei sämtlichen drei Hefen wird der Rand mehr oder weniger aufgewulstet und wallartig. Hefe 25 und Hefe 170 unterscheiden sich äußerlich noch wenig. Dagegen hat sich bei Hefe Rio bereits eine neue charakteristische Erscheinung in der Entwickelung der Riesenkolonieen bemerkbar gemacht (Tafel I, Fig. 1).

Schon bei der Betrachtung der Riesenkolonieen der Hefen 25 und 170 fällt es auf, daß die äußere Begrenzung nicht mehr den regelmäßigen Verlauf nimmt, sondern bereits einige ausspringende Punkte an derselben vorhanden sind. Es sind dies die ersten Anlagen für die von Will als „Ströme" bezeichneten Anhänge der Unterseite der Riesenkolonieen, welche nach der Oberfläche der Gelatine hinwachsen und deren Auftreten den Riesenkolonieen erst das charakteristische Gepräge verleiht. Bei der Oberhefe Rio sind diese Ströme schon ziemlich deutlich ausgeprägt und von der zentralen Partie und dem Walle der jungen Riesenkolonie scharf geschieden. Auffällig hierbei ist die einseitige Ausbildung der Ströme, die übrigens bei der Oberhefe Rio öfters wiederkehrt (siehe auch Stamm Rio auf Tafel II, Fig. 1). Es scheint diese Neigung zur einseitigen Anlage scharf ausgeprägter Ströme eine besondere Eigenschaft dieser Hefe zu sein.

Wurden die Kolonieen in diesem Entwickelungsstadium mit weicher Gelatine überschichtet, einige Zeit in Eis gestellt und dann nach dem Erstarren sorgfältige Schnitte durch die Kulturen ausgeführt, so zeigten sich bereits am Rande der Kolonieen, vor allem bei Hefe Rio mit ihren relativ stark ausgeprägten Strömen, auf der Unterseite der Kolonieen Andeutungen von warzenähnlichen Anhängen, die ersten Anlagen der später so stark entwickelten „Rhizoiden".

Die mikroskopische Untersuchung bot in diesem Stadium der Entwickelung im allgemeinen das gleiche Bild bei sämtlichen drei Hefen. Die zentrale Partie der Riesenkolonieen des Stammes Rio besteht aus den Zellen der Einsaat, welche die für Rio normalen elliptischen und ovalen Formen besitzen. Die Membran dieser Zellen hat unterdessen eine ziemliche Verdickung erfahren, das Plasma ist durch große Vakuolen bis auf eine dünne Wandschicht reduziert. Zwischen diesen und an diesen Zellen finden sich kleine runde und elliptische Zellen (ca. 6—7 : 4 μ) mit homogenem Plasma und zarter Membran. Die wallartige Randpartie weist jedoch immer mehr wurstförmige zarte Zellen auf (14—16 : 4—5 μ), die in den Strömen vorherrschend sind. Lange, fest zusammenhaltende Sproßverbände sird indessen selten. Die zentrale Partie der Unterseite besteht größtenteils aus Zellen der Bodensatzform. Bei den Riesenkolonieen der Hefe 25 besteht die zentrale Partie (die ich der Kürze halber als „Teller“ bezeichnen möchte) ebenfalls nur aus den Zellen der Aussaat, zwischen diesen befinden sich in großer Anzahl kleinere ovale Zellen mit homogenem Plasma und zarter Membran. In der Randpartie zeigen sich indessen jetzt auch bei Hefe 25 langgestreckte, oft gekrümmte Zellen mit zarter Membran und homogenem Zellinhalt. Auf der Mitte der Unterseite finden sich Bodensatzzellen neben kleinen ovalen Zellen. Oberhefe 170 zeigt in 48 Stunden alten Riesenkolonieen im „Teller“ Bodensatzzellen, deren Membran etwas verdickt und deren Plasma durch große Vakuolen stark reduziert ist[1]). Daneben finden sich zahlreiche zartwandige Zellen mit homogenem Plasma (Größe 6—7 μ), die spitzovale bis birnförmige Gestalt besitzen. Der Wall mit den Andeutungen der Ströme besteht fast ausschließlich aus gestreckt-ovalen bis wurstförmigen zarten Zellen, ebenso die Randpartie der Unterseite, während deren Mitte meist aus Bodensatzzellen mit reduziertem Inhalt gebildet ist.

Die Zusammensetzung der Riesenkolonieen der drei obergärigen Bierhefen ist also nach 48 Stunden die gleiche; es bestehen höchstens graduelle Unterschiede zwischen denselben. In der Entwickelung der Kolonieen war aber Hefe Rio den beiden anderen Hefen ziemlich weit voraus; auch gegenüber den vier untergärigen Hefen von Will, besonders gegenüber den Stämmen 93 und 7 zeigen die drei Oberhefen entsprechend ihrem schnelleren Wachstum in flüssigem Nährsubstrat einen gewissen Vorsprung in der Entwickelung der Riesenkolonieen.

Was die Natur der bei allen drei Hefen beobachteten kleineren Hefenzellen betrifft, so sind sie nach ihrer Form, ihrem Aussehen, der Homogenität des Plasmas und der Zartheit der Membran den Kahmhautzellen 1. Generation sehr ähnlich. Dazu kommt noch der verhältnismäßig große Reichtum dieser Zellen an Glykogen und insbesondere ihre Abstammung. Gerade in den 48 Stunden alten Riesenkolonieen war oft die Erscheinung zu beobachten, daß eine größere Anzahl dieser kleinen Zellen, oft 5—6, rings an einer Mutterzelle vom Typus der Bodensatz-

---

1) In diesen Präparaten konnte das von Hansen*) und Will**) beschriebene „gelatinöse Netzwerk“ zwischen den Bodensatzzellen in besonders schöner und deutlicher Ausbildung beobachtet werden.

*) Hansen, E. Chr., Vorläufige Mitteilung über Gärungspilze. (Botanisches Centralblatt. Bd. XXI. 1885. No. 6. p. 181.)

**) Will, H., Ueber einen ungeformten Eiweißkörper, welcher der untergärigen Bierhefe beigemengt ist und dessen Beziehungen zu dem sogenannten gelatinösen Netzwerk etc. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1897. p. 447 ff.)

zellen aussproßte. Auch bei den untergärigen Hefen konnte Will[1]) diese Art der Sprossung („Kronenbildung") in jungen Riesenkolonieen nicht selten konstatieren. Ebenso tritt die von Will beschriebene Erscheinung der „Sterigmenbildung" an den Mutterzellen auch bei den obergärigen Hefen oft auf, indem an den Stellen, an welchen kleine Tochterzellen aussproßten, die Mutterzellen ein scharf hervortretendes Spitzchen (Sterigma) zeigten (p. 27, Fig. 6a). Auch die in der Randzone der Riesenkolonieen auftretenden langgestreckten Formen gleichen nach allen Merkmalen (zarte Membran, homogenes Plasma, Abstammung von Bodensatzzellen oder kleinen rundlichen, den entsprechenden Hautzellen 1. Generation bei den untergärigen Hefen ähnlichen Zellen) den im allgemeinen nach 2—3 Wochen bei mittlerer Temperatur in den Häuten der drei obergärigen Hefen auftretenden wurstförmigen, gestreckten Zellen, welche ja gerade bei den Oberhefen besonders reichlich vorkommen.

Es zeigen also auch die jungen Riesenkolonieen der drei obergärigen Bierhefen im Verlaufe der Entwickelung analoge Zellformen wie in jungen Hautbildungen, ebenso wie dies Will für seine untergärigen Bierhefen gezeigt hat. Im Gegensatz zu der regellosen Lagerung der Zellen in den Häuten sind aber in der Riesenkolonie diese verschiedenen Zellformen regelmäßig angeordnet, indem Zellen der Aussaat und kleine rundliche bis ovale Zellen die Mitte der Riesenkolonie einnehmen, während deren Rand (der Wall und die Ströme) aus langgestreckten Zellen besteht.

Nach 3 Tagen zeigen die Riesenkolonieen weitere Fortschritte in der Entwickelung der Randpartie, doch sind dieselben bei den Oberhefen 25 und 170 nicht besonders auffallend. Bei der Oberhefe Rio macht sich eine immer reicher werdende Gliederung des Randes bemerkbar, doch sind auch hier die Dimensionen der Ströme bei normal wachsenden Riesenkolonieen gegenüber dem tief eingesenkten zentralen Teil noch ziemlich klein. In Beziehung auf die vorhandenen Zellformen und ihre Anordnung in den Riesenkolonieen ist keine weitere Aenderung eingetreten.

Am 5. Tage treten die Unterschiede, welche sich zwischen Oberhefe Rio und 170 einerseits und Oberhefe 25 andererseits ergaben, schon sehr deutlich hervor. Die Ströme in der ca. 3 mm breiten Randpartie sind bei den beiden ersteren Hefen schon etwas gelappt, während die letztere einfache Ströme besitzt. Auch macht sich — besonders bei Hefe Rio — bereits eine Art Zonenbildung, gekennzeichnet durch konzentrische Streifung, bemerkbar. Radiale Streifung ist bei allen drei Hefen — wiederum besonders gut bei Hefe Rio — zu beobachten. Einen sehr hervortretenden Unterschied bildet auch das Verhältnis der zentralen Partie, des Tellers, zu den Strömen. Bei der Oberhefe 25 ist der Teller gegenüber den Strömen relativ wenig eingesenkt, das Hervorquellen der Ströme aus den an der Unterseite der Kultur befindlichen warzigen Anhängen ist sehr deutlich sichtbar. Die Oberfläche des Tellers ist glatt. Es sind dies Unterschiede, welche bei einer größeren Anzahl von Riesenkolonieen der Hefe 25 beobachtet wurden, so daß sie wohl nicht als zufällige Erscheinungen, sondern als eine bestimmte Eigenschaft der Hefe 25 zu betrachten sind. Bei den Oberhefen Rio und 170

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen. 1902. p. 246.)

ist dagegen der Teller ziemlich stark eingesenkt, die Oberfläche ist mit kleinen Warzen besetzt. Oberhefe 170 zeichnet sich bereits durch besondere Breite des Walles aus, der den Teller von den Strömen trennt. Die Unterseite der Kolonieen zeigt höckerige Auswüchse von ca. 0,5 mm Länge, welche besonders bei Oberhefe Rio eine ziemliche Ausdehnung besitzen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung, die auch an senkrechten Schnitten durch längere Zeit zum Härten auf Eis gestellte Kolonieen vorgenommen wurde, ergab sich folgendes:

Die Oberfläche des zentralen Teiles der Riesenkolonieen bestand zum größten Teil aus runden bis ovalen Zellen der Bodensatzform, deren Membran stark verdickt war. Gegen den Rand des Tellers traten dieselben etwas weniger hervor, indem hier die kleinen Zellen der 1. Hautgeneration mehr in den Vordergrund traten. Der äußere Teil des Walles sowie die Ströme sind oberflächlich von gestreckt ovalen Zellen gebildet, die Mitte der Riesenkolonieen nehmen fast ausschließlich lange wurstförmige, bisweilen auch bohnenförmig gekrümmte Zellen ein. Die kleinen Warzen, welche sich im Teller der Kolonieen von Rio und 170 finden, bestehen bei beiden Hefen aus kleineren runden Zellen, deren Membran verdickt und deren Plasma sehr körnig ist, jedoch keine größeren Oeltröpfchen enthält. Bei den Riesenkolonieen der Oberhefe Rio zeigen sich schon am 5. Tage zwischen den gestreckt ovalen und wurstförmigen Zellen der Oberfläche der Randpartie und der Ströme größere runde Zellen (9—11 μ) mit verdickter Membran und stark lichtbrechenden Tröpfchen im Plasma; diese Oeltröpfchen geben mit konzentrierter Schwefelsäure die charakteristische Grünfärbung, was darauf hindeutet, daß diese Zellen wohl den Dauerzellen ziemlich nahe stehen. Die Riesenkolonieen der Oberhefe 25 und 170 besitzen in diesem Entwickelungsstadium wohl ebenfalls an der Oberfläche der Randpartie und der Ströme Zellen mit verdickter Membran, die jedoch keine Oeltröpfchen im Plasma enthalten. Diese frühzeitige Ausbildung von Zellen, welche mit den Dauerzellen der Hautbildungen große Aehnlichkeit besitzen, ist eine auch schon beim Studium der Kahmhautentwickelung beobachtete, spezielle Eigenschaft der Oberhefe Rio, welche sie gegenüber den beiden anderen Hefen auszeichnet.

Gleichzeitig mit den vorher geschilderten Kolonieen waren Parallelversuche angestellt worden, um den Einfluß der Temperatur und den der Beschaffenheit der Würzegelatine festzustellen. Zu diesem Zweck wurden die Kolonieen bei 10—12° auf 10-proz. und auf 16-proz. Würzegelatine gezüchtet. Wie zu erwarten war, hatte die Erniedrigung der Temperatur von ca. 20° auf 10—12° eine beträchtliche Verzögerung im Wachstum zur Folge. Nach 4 Tagen hatten die Kolonien (Taf. I, Fig. 2) fast das gleiche Aussehen wie bei höherer Temperatur etwa 2 Tage alte Kolonieen. Bei den Oberhefen 25 und 170 ist die zentrale Partie wenig eingewölbst, die ganze Kolonie ziemlich stark und nicht in die Gelatine eingesenkt, Andeutungen der Ströme sind noch nicht vorhanden. Sehr deutlich tritt auch an diesen Kulturen die größere Wachstumsintensität der Oberhefe Rio in Erscheinung. Die Differenz in der Entwickelung ist zwischen den bei höherer und den bei niedrigerer Temperatur gewachsenen Kolonieen dieser Hefe keine besonders auffällige. Es ist höchstens eine etwas geringere Ausbildung der Ströme zu konstatieren.

Die mikroskopische Untersuchung dieser Riesenkolonieen ergab, daß auch bezüglich der Zellformen, welche die Kolonieen bildeten, dieselben

Verhältnisse vorliegen wie bei 48 Stunden alten, bei ca. 20° gewachsenen Kolonieen. Die Entwickelung wurstförmiger Zellen ist nur bei Oberhefe Rio eine intensivere und auch auf das Innere der zentralen Partie ausgedehnt. Bei den Kolonieen der beiden anderen Hefen finden sich wurstförmige Zellen nur in geringer Anzahl in der Randpartie, auf der Oberfläche und im zentralen Teil kommen neben den Zellen der Aussaat viele Hautzellen 1. Generation vor. „Kronenbildung" ist sehr häufig zu beobachten.

Die gleichaltrigen Riesenkolonieen auf 16-proz. Würzegelatine waren unterdessen so wenig gediehen, daß bis zur mikroskopischen Untersuchung noch einige Tage gewartet wurde. Der Hefebelag hatte sich stark in die Gelatine eingesenkt, war ziemlich flach und im Gegensatz zu den sonstigen Kolonieen etwas dunkler gefärbt. Nach 8 Tagen glichen die Kolonieen etwa denjenigen, welche bei 20° auf 10-proz. Gelatine 3 Tage alt waren. Bei den Hefen 25 und 170 waren neben einer ziemlich schwachen Ausbildung des Walles bereits die Anlagen der Ströme zu bemerken. Bei Hefe 170 macht sich schon eine hellere Färbung der Peripherie geltend. Hefe Rio ist auch hier den beiden anderen Hefen in der Entwickelung vorausgeeilt, die Ströme sind schon deutlich ausgebildet und durch eine intensive weiße Färbung und trockene Beschaffenheit auffallend (Taf. I, Fig. 4). Diese beiden letzteren Kennzeichen dehnen sich im Laufe der Entwickelung der Riesenkolonieen auch auf ihre übrigen Teile aus. Nach 46 Wochen sind die Kolonieen der Hefen Rio und 170 etwa 2 cm im Durchmesser groß, vollständig weiß, wie in der Regel die Oberflächen der auf konzentrierteren festen Nährböden wachsenden Kolonieen[1]), sehr flach auf der Gelatine ausgebreitet, und senden große, vielfach geteilte, durch ihre gewellte Oberfläche ausgezeichnete Ströme aus. Bei Hefe 25 war die anfänglich gute Entwickelung nach 3—4 Wochen zum Stillstand gekommen, die weiße mehlige Beschaffenheit der Oberfläche der Kolonieen hatte einer braungelben schleimigen Platz gemacht, bald darauf war die Farbe noch tiefgelber und die Beschaffenheit der Hefemasse sehr trocken geworden. Nach ca. 6 Wochen, also zu einer Zeit, in der die Riesenkolonieen der beiden Oberhefen Rio und 170 erst zur vollkommenen Ausbildung gelangt waren, waren die Riesenkolonieen der Oberhefe 25 auf 16-proz. Würzegelatine vollständig vertrocknet und verkümmert. Diese geringe Lebensdauer der Riesenkolonieen trat auch fortgesetzt bei sämtlichen älteren Kulturen zu Tage (siehe auch Taf. II, Fig. 2), so daß sie als sehr charakteristischer Unterschied gegenüber den Hefen Rio und 170 angesehen werden muß.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der 8 Tage alten, auf 16-proz. Würzegelatine bei 10—12° gewachsenen Riesenkolonieen ergab sich bei allen drei Hefen durchweg, daß die Form der Zellen im allgemeinen eine kleinere ist, die Membran dagegen überall eine merkliche Verdickung erfahren hat, auch bei den zahlreich zur Ausbildung gekommenen Hautzellen 1. Generation (häufig Kronenbildung). Sämtliche Zellen zeigen starke Glykogenreaktion. Der Rand und die weißgefärbten Stromanlagen bei der Oberhefe Rio bestehen aus gestreckt ovalen Zellen, bei den Hefen 25 und 170 ist der Wall und die Andeutungen der Ströme aus kleinen gestreckten Zellen (8—9 : 2—3 μ) gebildet, die oft

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1904. p. 177.)

die bizarrsten Formen angenommen haben und jedenfalls pathologische Formen darstellen.

Die Erniedrigung der Temperatur hat also im wesentlichen nur einen retardierenden Einfluß auf das Wachstum der Riesenkolonieen. Dagegen bringt die Erhöhung der Konzentration der Würzegelatine, wie nicht anders zu erwarten war, nicht nur ebenfalls eine Verzögerung im Wachstum der Kolonieen mit sich, sondern verursachte auch eine, wenn auch nicht bedeutende, Veränderung in der Erscheinung der Riesenkolonieen und der sie zusammensetzenden Zellelemente. Es sind aber diese Unterschiede durchaus nicht prinzipielle, sondern nur graduelle. Die Kolonieen werden kompakter und manche Erscheinungen, welche an den Kolonieen auf geringerprozentigerem Substrat nur angedeutet sind (konzentrische Streifung), werden schärfer ausgeprägt (gewellte Oberfläche). Ebenso sind die kleineren und gedrungeneren Zellen nur auf die höhere Konzentration des Nährbodens zurückzuführen, wie denn überhaupt höhere Konzentrationen ungünstiger für die Entwickelung der Hefezellen sind. Die für die Oberhefe Rio charakteristische frühzeitige Anlage der Ströme kommt auch auf höher konzentriertem Nährboden zum Ausdruck, ein noch schärferer Unterschied zwischen den Oberhefen Rio und 170 einerseits und der Oberhefe 25 andererseits ist durch die vorzeitig eintretende Verkümmerung und Vertrocknung der Riesenkolonieen dieser Hefe auf höher konzentrierter Würzegelatine gegeben. Eine ähnliche Beobachtung konnte übrigens Lindner[1]) bezüglich der untergärigen Bierhefe Saaz machen.

Im weiteren Verlauf der Entwickelung der Riesenkolonieen machen sich allmählich jene Unterschiede in der Wachstumsform immer mehr bemerkbar, durch welche eine Trennung der drei obergärigen Bierhefen in 2 Gruppen ermöglicht wird, und welche schon am 5. Entwickelungstag, wenn auch noch wenig auffallend, konstatiert werden konnten. Nach 15 Tagen (Taf. II, Fig. 1) hatten die Riesenkolonieen, je nach der Größe des aufgetragenen Hefetropfens, einen Durchmesser von 1—1,5 cm, gelblichweiße Farbe und die Konsistenz gewöhnlicher, gepreßter Hefe. Die Oberhefe Rio ist den beiden anderen Hefen wieder in der Entwickelung vorausgeeilt. Der tief eingesenkte Teller ist durch einen aufgewulsteten steilen Rand begrenzt, an den fast unmittelbar sich die Ströme anschließen. Der Boden des Tellers ist mit Warzen besetzt, der Wall sowie die Ströme zeigen eine konzentrische, terrassenförmige Streifung. Beachtenswert ist auch hier wieder die bereits erwähnte eigentümliche einseitige Ausbildung der Ströme bei Oberhefe Rio. Die einzelnen Ströme sind durch sehr tief einschneidende Furchen getrennt, breiten sich weit und fächerförmig aus und sind tief gebuchtet, infolgedessen ist die Peripherie der Riesenkolonie sehr unregelmäßig. Oberhefe 170 zeigt stark höckerige Beschaffenheit der Telleroberfläche. Bemerkenswert ist der relativ breite Wall, der diese von den Strömen trennt. Die Furchung ist noch wenig ausgebildet, infolgedessen erscheinen die Ströme noch wenig getrennt und auch in den Strömen selbst ist die Ausbildung der einzelnen Teilströme noch wenig sichtbar. Indessen ist doch die Peripherie der Kolonie ziemlich stark gebuchtet und, wenigstens im Vergleich zu den Kolonieen der Oberhefe 25, unregelmäßig. Bei der Kolonie der Oberhefe 25 ist der Teller glatt, der

1) Lindner, P., Das Wachstum der Hefen auf festen Nährböden. (Wochenschr. f. Brauerei. 1893. p. 693.)

Wall wenig steil und aufgewulstet. Die Furchung, welche durch die Ausbildung der Ströme bedingt wird, ist ziemlich flach, die Ströme selbst sind fast gänzlich ungeteilt. Die Peripherie der Kolonie besitzt deshalb eine gewisse Regelmäßigkeit der Ausbuchtung.

Bei gleichaltrigen Kolonieen, welche auf 16-proz. Würzegelatine gewachsen waren, kam der Unterschied in der Ausbildung der Ströme noch mehr zum Ausdruck. Oberhefe Rio und Oberhefe 170 besaßen fächerförmig ausgebreitete, vielfach gelappte und gebuchtete Ströme, die sich durch eine infolge ihrer intensiv weißen Farbe kenntliche Zuwachszone von der Unterseite der Kolonie her immer mehr ausdehnten. Oberhefe 25 dagegen besaß kompakte, wenig geschiedene Ströme, die kaum eine Spur von Buchtung und Teilung zeigten.

Bei vorsichtigen Schnitten durch 2—3 Wochen alte Kolonieen konnte auch ein bedeutender Fortschritt in der Ausbildung der schon erwähnten höckerigen Anhänge an der Unterseite der Riesenkolonieen beobachtet werden. Figur 2 (Taf. III) stellt einen Versuch dar, diese von Will als „Rhizoïden" bezeichneten Gebilde zu photographieren, was wegen der geringen Durchlässigkeit der rotbraunen Würzegelatine für chemisch wirksame Strahlen nicht ohne Schwierigkeit war. Auf den ersten Blick fällt hier die Kolonie der Oberhefe Rio wegen ihrer großen traubigen „Rhizoïden" auf. Auch bei der Oberhefe 170 ist die reiche Verzweigung der Ströme durch die mehr oder weniger reiche Teilung der „Rhizoïden" bedingt. Gegenüber den beiden Stämmen Rio und 170 macht die Kolonie der Oberhefe 25 schon auf der Unterseite den Eindruck eines mehr kompakten und regelmäßigen Gebildes. Ebenso wie die verschiedene Ausbildung der Ströme, läßt also auch die Form der „Rhizoïden" deutliche Unterschiede zwischen den drei Hefen erkennen, besonders deutlich ist die Trennung von Rio und 170 einerseits und 25 andererseits. Es ist dies auch ganz naturgemäß, da nach den Untersuchungen Wills die Strömung eben nur an der Oberfläche der Gelatine besonders ausgebildete „Rhizoïden" sind. Uebrigens wird die Angabe Wills[1]), daß die „Rhizoïden" eine zentripetale Ausbildung zeigen, durch die bildliche Darstellung der „Rhizoïden" bestätigt. Ihre ersten Anlagen erscheinen am Rande der Kolonie und von hier aus setzt sich ihre weitere Ausbildung gegen die Mitte zu fort, so daß die am Außenrande des Rhizoïdenkranzes stehenden Auswüchse sich schon durch ihre geringeren Dimensionen als Neubildungen kennzeichnen.

Was die Zellelemente betrifft, welche die Riesenkolonieen in diesem Stadium der Entwickelung zusammensetzen, so hat sich im allgemeinen wenig geändert. Nur hat sich die Scheidung der die Riesenkolonieen zusammensetzenden Zellformen in zwei Schichten deutlich vollzogen. Die oberflächlichen Schichten der Kolonieen, die „Rindenschicht", setzen sich ausschließlich aus runden oder ovalen Zellen mit mehr oder weniger verdickter Membran und mit einem reichlich von Oeltröpfchen durchsetzen Plasma zusammen, nur in der Oberfläche des Tellers herrschen rundliche Zellen vor, welche teils den Bodensatzzellen, teils den Hautzellen 1. Generation ähnlich sind. Der übrige unter der Rindenschicht gelegene Teil der Kolonie, sowohl die Randpartie als auch die Unterseite mit den „Rhizoïden" besteht aus Sproßverbänden sehr langgestreckter, meist wurstförmiger Zellen. Diesen Teil der Riesenkolonie nennt Will „die Markschicht".

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1902. p. 265.)

Innerhalb des vorstehend geschilderten allgemeinen Schemas des anatomischen Baues der Riesenkolonieen machen sich nun bei den drei obergärigen Hefen mehrfache Unterschiede bemerkbar, besonders hinsichtlich der Zusammensetzung der Ströme und „Rhizoiden". In diesen herrschen fast ausschließlich bei Hefe Rio große Sproßverbände langgestreckter wurstförmiger Zellen mit zarter Membran und reichem Glykogengehalt vor. Querwände wurden niemals beobachtet. In den Strömen bilden ebenfalls diese wurstförmigen zarten Zellen die überwiegende Mehrzahl, doch liegen zwischen ihnen, besonders gegen die Oberfläche zu, einzelne Nester typischer Dauerzellen, oft mit breiter Basis einander aufsitzend. Hin und wieder konnte auch beobachtet werden, daß einzelne dieser Dauerzellen eine wurst- oder schlauchförmige derbwandige Tochterzelle erzeugt hatten, die ganz das Aussehen echter Hautzellen der 2. Generation besaßen (Länge 20—24 μ, Breite 4—5 μ). Das frühzeitige Auftreten echter Dauerzellen in den Strömen ist für Oberhefe Rio charakteristisch und analog der gleichen Eigenschaft bei der Entwickelung der Haut auf flüssigem Nährsubstrat. Auch bei den Hefen 25 und 170 bestehen die Ströme und „Rhizoiden" aus zartwandigen wurst- bezw. birnförmigen Zellen. Ebenso finden sich in den Strömen vereinzelt typische Dauerzellen, bei denen jedoch niemals das Aussprossen von derben langgestreckten Tochterzellen beobachtet wurde. In den Rhizoiden fanden sich niemals Dauerzellen vor.

Bezüglich der Entwickelung der jungen Riesenkolonieen und der sie zusammensetzenden Formen besteht also im allgemeinen eine Uebereinstimmung zwischen den drei obergärigen Hefen, die Unterschiede sind nur graduelle, indem Oberhefe Rio sowohl hinsichtlich der Entwickelung der ganzen Kolonie als auch hinsichtlich des Auftretens der verschiedenen aufeinanderfolgenden Zellgenerationen den beiden anderen Hefen vorauseilt. Sehr bald macht sich auch eine Differenzierung durch den Habitus der Kolonieen, besonders durch die Ausbildung der Ströme bemerkbar, durch welche Oberhefe Rio und 170 einerseits, von Oberhefe 25 andererseits geschieden werden. Gegenüber den vier untergärigen Hefen Wills ist die Entwickelung der Riesenkolonieen entsprechend dem schnelleren Wachstum der obergärigen Hefen eine etwas intensivere. Als einziger bemerkenswerter Unterschied im Bau der Riesenkolonie bei den obergärigen Hefen ist die relativ frühzeitige (15 Tage) Ausbildung typischer Dauerzellen zwischen den langgestreckten zarten Zellen der Ströme; in den jungen Riesenkolonieen seiner vier untergärigen Hefen auf 10-proz. Würzegelatine hat Will niemals in den Strömen typische Dauerzellen beobachtet. Im übrigen vollzieht sich die Entwickelung der Riesenkolonieen bei den drei obergärigen Hefen nach den gleichen Grundsätzen, die Will für seine untergärigen Hefen feststellen konnte. Oberhefe 25 zeigt in Bezug auf die etwas spätere Ausbildung von langgestreckten Zellen (s. p. 42) eine gewisse Aehnlichkeit mit der untergärigen Bierhefe, Stamm 7.

Die Entwickelung der Riesenkolonieen der drei obergärigen Bierhefen erfolgt nun nach den angegebenen Grundzügen auf die Art weiter, daß von der Unterseite her immer neue Zuwachszonen auftreten. Es entstehen so ca. 2—3 cm im Durchmesser große Kolonieen mit den für

die betreffende Hefeart charakteristischen, schön ausgeprägten Wachstumserscheinungen. Figur 2 auf Tafel II stellt vollkommen ausgewachsene ca. 2 Monate alte Riesenkolonieen der beiden Oberhefen Rio und 170 dar, welche die allgemeine Uebereinstimmung in der Ausbildung der Ströme und doch auch wieder die feineren Unterschiede zwischen den beiden Hefen zeigen. Die Farbe der Kolonieen ist grauweiß, die Oberfläche ziemlich trocken, die jüngste Zuwachszone, die sich „spitzenartig“ um die ganze Peripherie der Kolonie legt, durch etwas hellere Färbung auszeichnet. Die beiden Kolonieen zeigen scharf getrennte, in einzelne Lappen zerteilte, reich gegliederte Ströme, ihre Oberfläche ist leicht gewellt. Der bereits erwähnte konstante Unterschied zwischen den Kolonieen der beiden Hefen ist sehr gut ausgebildet; es ist dies die starke Aufwulstung des Walles bei Hefe Rio, während bei Hefe 170 der Wall relativ flach und breit ist. Die Riesenkolonie der Oberhefe 25 besitzt nach ca. 2 Monaten ebenfalls eine weißgelbe Farbe und ziemlich trockene Beschaffenheit. Der Teller ist an der Oberfläche glatt und nicht besonders stark eingesenkt. Der Wall ist wenig steil und sehr breit. Die Ströme sind durch relativ seichte Furchen voneinander getrennt, sie selbst sind sehr wenig gegliedert und ihre Oberfläche ist fast vollständig glatt. Während bei den Oberhefen Rio und 170 die „Rhizoiden“ gut ausgebildet und ziemlich stark geteilt sind, besitzen die „Rhizoiden“ der Oberhefe 25 auch in den ausgewachsenen Riesenkolonieen einfache Warzenform; sie sind fast gar nicht geteilt. Bemerkenswert ist ferner, daß die ausgewachsenen Riesenkolonieen der Oberhefe 25 im Gegensatz zu den beiden anderen Hefen gegen Temperatureinflüsse sehr empfindlich sind. Durch die etwa vierstündige Einwirkung einer Temperatur von ca. 20°, wie sie durch das Photographieren bedingt war, ist, wie Figur 2 der Tafel II zeigt, die Kolonie der Oberhefe 25 oberflächlich schon stark verschleimt. Wie bereits erwähnt, ist diese Neigung der Riesenkolonieen der Oberhefe 25, frühzeitig zu verschleimen oder zu verkümmern, ein gutes Unterscheidungsmerkmal gegenüber den beiden anderen Oberhefen Rio und 170.

Die mikroskopische Untersuchung von Schnitten aus ausgewachsenen Riesenkolonieen zeigt keinen wesentlichen Fortschritt in der Entstehung neuer Zellelemente in denselben. Die echten Dauerzellen, welche bei der Oberhefe Rio zwischen den langgestreckten Zellen der Ströme gefunden wurden, sind etwas häufiger geworden, ebenso werden sie jetzt auch zwischen den langgestreckten Zellen der Ströme bei Hefe 25 etwas häufiger angetroffen, während sie bei Hefe 170 immer noch selten sind. Im übrigen ist die Verteilung der verschiedenen Zellformen in der Mark- und Rindenschicht noch die nämliche wie bei den 2—3 Wochen alten Kolonieen.

Unter besonders günstigen Umständen (im Winter) gelang es, Riesenkolonieen der drei obergärigen Bierhefen 5 Monate zu erhalten, ohne daß allzu starke Verschleimung und Verflüssigung der Gelatine eingetreten wäre (Tafel III, Figur 1). Die Kolonieen der obergärigen Hefen Rio und 170 fallen auch hier sofort durch die reiche Gliederung der Ströme auf. Der Teller der Hefe Rio zeigte eine kraterähnliche Vertiefung, die mit Schleim gefällt war. Der Wall ist wieder sehr steil und aufgewulstet, während dagegen die Kolonie der Oberhefe 170 einen flachen und breiten Wall besitzt. Die Oberfläche der Ströme ist besonders bei der Hefe Rio fein gekräuselt. Die Farbe der Riesenkolonieen ist ein schmutziges Gelb, die feuchtglänzende Beschaffenheit der Ober-

fläche zeigt die beginnende Verschleimung an. Die Kolonie der Oberhefe 25 ist auch hier durch ihren kompakten Bau, durch wenig ausgeprägte Trennung der einzelnen Ströme und durch den fast völligen Mangel an Gliederung bei denselben leicht kenntlich. Die „Rhizoiden" sind bei den Kolonieen sämtlicher drei Hefen tief in die Gelatine eingewachsen und zeigen die für die betreffende Hefe charakteristische Form und Anordnung.

Interessant war der anatomische Bau dieser 5 Monate alten Riesenkolonieen. Bei der Oberhefe Rio besteht die Oberfläche des Tellers der Kolonie aus runden und ovalen Zellen von der Größe der Bodensatzzellen, ihre Membran ist ziemlich stark verdickt, das Plasma körnig und mit einzelnen großen Oeltröpfcheu durchsetzt. Sie sind also wohl als Dauerzellen anzusprechen. Die Reaktion auf Glykogen bei diesen Zellen war schwach. Typische Hautzellen 1. Generation sind an der Oberfläche der Kolonie selten anzutreffen, ebenso auch im stark aufgewulsteten Ring, dagegen sind sie in der Oberfläche der Ströme ziemlich häufig. Der Inhalt des auf der Telleroberfläche befindlichen Schleimkraters enthielt neben zahlreichen Dauerzellen ein dichtes Geflecht derber wurstförmiger Zellen mit einem reichlich von Oeltröpfchen durchsetzten Plasma, die den Hautzellen 2. Generation in älteren Hautbildungen vollständig gleichen. Die Ströme sind von einer oberflächlichen Schicht gedrungener Zellen bedeckt, sehr häufig sind runde Zellen, welche sich trotz der zahlreichen Oeltröpfchen im Plasma und des, wenn auch schwachen Glykogengehaltes doch durch ihre geringere Größe und die geringere Dicke der Membran von typischen Dauerzellen unterscheiden. Die inneren Partieen der Ströme und des zentralen Teiles, die Markschicht bestehen vornehmlich aus langgestreckten schlanken Zellen. Besonders gegen die Oberfläche zu finden sich zahlreiche Nester von Dauerzellen, welche oft 2—3 keimschlauchähnliche derbe Tochterzellen (Hautzellen 2. Generation) besitzen. Die „Rhizoiden" bestehen ausschließlich aus einem dichten Geflecht schlanker wurstförmiger Zellen mit ziemlich großen Vakuolen und stark reduziertem, ziemlich homogenem Plasma. Bohnenförmig gekrümmte und verzerrte Zellen sind häufig.

Bei der Kolonie der Oberhefe 25 sind in der Oberfläche des Tellers die Zellen mit verdickter Membran und körnigem Inhalt, welche die Größe der Bodensatzzelleu besitzen, nicht besonders häufig, sehr zahlreich dagegen sind ovale und elliptische Zellen der 1. Hautgeneration. Auch einige Riesenzellen wurden beobachtet. Diese ovalen und elliptischen Zellen erstrecken sich über die ganze Oberfläche der Kolonie in charakteristischen kurzen Sproßverbänden, in der Rindenschicht der Ströme sind daneben auch kleinere rundliche Zellen mit verdickter Membran und einigen wenigen Oeltröpfchen. Die Markschicht der Ströme besteht aus zarten schlanken wurstförmigen, bisweilen auch keulenförmigen Zellen, zwischen denen vereinzelte Nester typischer Dauerzellen liegen. Ein Aussprossen derselben mit derben, langgestreckten Tochterzellen wurde nicht beobachtet. Die zentrale Partie der Markschicht und die „Rhizoiden" bestehen ausschließlich aus schlanken wurstförmigen Zellen in reichen Sproßverbänden. Die zarte Beschaffenheit der Membran und des Plasmas dieser langgestreckten Zellen unterschied sie scharf von den Zellen der 2. Hautgeneration, obwohl sie bezüglich der äußeren Gestalt manche Aehnlichkeit mit ihnen aufwiesen.

Der Teller bei den Riesenkolonieen der Hefe 170 zeigt ebenfalls wenig echte Dauerzellen; runde und eiförmige Bodensatzzelllen, welche

durch die Verdickung der Membran den echten Dauerzellen zwar nahe stehen, sich aber doch durch ihr durch große Vakuolen stark reduziertes, nur wenige Oeltröpfchen enthaltendes Plasma von diesen unterscheiden, setzen die Oberfläche des Tellers fast ausschließlich zusammen. Oft sprossen aus diesen Zellen zahlreiche typische birnförmige Hautzellen 1. Generation. Kronenbildung ist häufig, nicht selten sind auch Riesenzellen zu beobachten. Die Oberfläche des Walles und der Ströme ist vorwiegend aus gedrungenen Hautzellen 1. Generation gebildet, deren Membran oft eine leichte Verdickung erfahren hat. Daneben finden sich kleine runde Zellen mit ebenfalls leicht verdickter Membran und zahlreichen Oeltröpfchen im Plasma, gegen die Peripherie der Kolonie auch etwas gestrecktere Formen. Die Markschicht der Ströme und die „Rhizoiden" sind fast ausschließlich aus zarten, langgestreckten, oft gekrümmten Zellen gebildet, die meist große Vakuolen und ziemlich reichen Glykogengehalt besitzen. Auch echte Dauerzellen kommen, allerdings sehr selten, in den Strömen der Riesenkolonieen der Oberhefe 170 vor; einzelne derselben hatten 2—3 lange keimschlauchähnliche Tochterzellen mit derber Membran und körnigem Plasma erzeugt.

Der Grundplan, nach dem die 5 Monate alten Riesenkolonieen der drei obergärigen Hefen zusammengesetzt sind, ist also ebenso wie früher bei allen drei Hefen der gleiche, wie ihn Will für den Aufbau der Riesenkolonieen seiner untergärigen Bierhefen angibt. Bemerkenswert ist die Gegenwart zahlreicher typischer Hautzellen 2. Generation in dem auf der Telleroberfläche bei Hefe Rio befindlichen Schleimkrater, da auch Will[1]) die gleiche Beobachtung machen konnte. Trotz dieser fast allgemeinen Uebereinstimmung im anatomischen Bau der Riesenkolonieen besteht doch zwischen den vorliegenden drei obergärigen Hefen und den untergärigen Bierhefen Wills ein markanter Unterschied: es ist dies das die bei sämtlichen drei obergärigen Hefen beobachtete, mehr oder minder häufige Vorkommen echter Dauerzellen zwischen den zarten, langgestreckten Zellen der Ströme und das Aussprossen derselben in langen keimschlauchähnlichen derben Tochterzellen der 2. Hautgeneration, die sich deutlich von den zwar ebenfalls langgestreckten, aber zarteren und schlankeren Zellen ihrer Umgebung abhoben. Nach den Angaben Wills[2]) treten bei seinen untergärigen Hefearten typische Dauerzellen und Hautzellen 2. Generation nur in der Oberfläche der zentralen Partie der Riesenkolonieen auf, in den Strömen wurden sie niemals beobaahtet. Im übrigen sei noch darauf hingewiesen, daß die späte und seltene Ausbildung von Dauerzellen in den Riesenkolonieen der Oberhefe 170 ein Analogon in der gleichen Erscheinung bei der Hautentwickelung besitzt.

Ein Rückblick auf die im Vorstehenden beschriebenen Untersuchungen über die Entwickelung und den anatomischen Bau der Riesenkolonieen der drei obergärigen Bierhefen zeigt, daß sie sich hinsichtlich des Habitus der Kolonieen scharf in zwei Gruppen trennen lassen, deren eine, gekennzeichnet durch die reiche Gliederung der Ströme und „Rhizoiden" von den Oberhefen Rio und 170 gebildet wird, deren zweite Oberhefe 25 mit ihren kaum gegliederten, mehr kompakten „Rhizoiden" und Strömen darstellt. Hinsichtlich des anatomischen Baues der Riesenkolonieen zeigt Hefe Rio schon frühzeitig eine beträchtliche schnellere Entwickelung der

---

1) Will, H., Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. (Zeitschrift für das gesamte Brauwesen. 1904. p. 194.)

2) Will, H., ibid. 1904. p. 193 ff.

verschiedenen, die Riesenkolonieen aufbauenden Zellformen. Besonders charakteristisch ist das frühzeitige Vorkommen echter Dauerzellen und der aus diesen erzeugten, den Hautzellen 2. Generation gleichenden Tochterzellen. Sowohl wegen dieser größeren Intensität der Entwickelung als auch im äußeren Habitus der Riesenkolonieen besitzt Oberhefe Rio eine gewisse Aehnlichkeit mit dem untergärigen Stamm 6 der von Will untersuchten Bierhefen. Der Habitus der Riesenkolonieen der Oberhefe 170 ist demjenigen der Kolonieen der Hefe Rio sehr ähnlich, in Bezug auf die Intensität der Entwickelung nimmt sie eine gewisse Mittelstellung zwischen den Hefen Rio und 25 ein. Mit letzterer Hefe hat sie das relativ seltene und späte Auftreten von echten Dauerzellen gemein. Oberhefe 25 endlich unterscheidet sich von den beiden anderen Hefen schon durch den kompakten Bau ihrer Riesenkolonieen, ferner durch die spätere Ausbildung gestreckter Zellen in jungen Kolonieen und durch ihre Neigung zu vorzeitiger Verkümmerung und Verschleimung. Hinsichtlich dieser Punkte ist sie dem untergärigen Stamm 7 von Will nicht unähnlich.

Das Studium der Riesenkolonieen und ihrer Entwickelung hat gezeigt, daß in dieser Hinsicht zwischen den obergärigen und den untergärigen Bierhefen Unterschiede nicht bestehen. Die geringen zuweilen zu Tage tretenden Differenzen sind nur graduelle und nicht schärfer ausgeprägt, als dies auch zwischen einzelnen Arten von untergäriger Bierhefe der Fall ist. Auch bei den obergärigen Bierhefen beteiligen sich am Aufbau der verschiedenen Partieen der Riesenkolonieen die gleichen Zellelemente in der nämlichen Reihenfolge, wie dies Will für seine untergärigen Bierhefen festgestellt hat. Allerdings konnten in vielen Fällen bei den drei obergärigen Hefen in einem gewissen Entwickelungsstadium der Kolonieen, wie bereits bemerkt, innerhalb der Ströme echte Dauerzellen mit ihren, den Hautzellen 2. Generation gleichen Tochterzellen beobachtet werden, die nach den Untersuchungen Wills in den Strömen seiner untergärigen Bierhefen niemals vorkommen. Ob damit tatsächlich ein prinzipieller Unterschied zwischen obergärigen und untergärigen Hefen gegeben ist, müßten erst weitere vergleichende Untersuchungen definitiv entscheiden.

Nach den vorliegenden Untersuchungen eignet sich zwar die Wachstumsform der obergärigen Hefen auf festem Nährboden sehr gut zur Charakterisierung der einzelnen Arten, sie läßt jedoch keine definitive Entscheidung zu, ob obergärige oder untergärige Bierhefe vorliegt.

Die zweite Entwickelungsphase der Riesenkolonieen, welche nach den Angaben Wills bei den untergärigen Bierhefen hauptsächlich durch das Auftreten derber wurstförmiger oder anders geformter Zellen (Hautzellen 2. Generation) in der zentralen Partie und nahe der Oberfläche charakterisiert ist, trat bei den untersuchten drei obergärigen Hefen nicht in Erscheinung, wenn auch einige diesbezügliche Beobachtungen an den 5 Monate alten Kolonieen der Oberhefe Rio[1]) darauf hindeuten, daß bei der Verwendung eines festen Nährbodens, der für das Auftreten der zweiten Entwickelungsphase günstiger ist, als die reine 10-proz. Würzegelatine, auch bei den obergärigen Bierhefen diese zum Ausdruck kommt.

---

1) Siehe V. Abschnitt p. 51.

VI. Chemisch-physiologische Eigenschaften der drei obergärigen Bierhefen.

Zu einer einigermaßen auf Vollständigkeit Anspruch machenden Charakteristik einer Hefeart gehört unstreitig auch eine Darstellung ihres chemisch-physiologischen Verhaltens, vor allem gegenüber den Zuckerarten. Wenn ja einerseits die physiologischen Eigenschaften der Hefen allein wohl nicht zur vollständigen Differenzierung der verschiedenen Hefearten genügen dürften oder gar, wie dies A. Bau[1]) vorgeschlagen hat, zur Aufstellung eines natürlichen Systems verwendet werden können, so wäre es doch auch andererseits gewiß unrichtig, bei vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Hefearten sich lediglich auf die Festlegung von morphologischen und entwickelungsgeschichtlichen Unterschieden zu beschränken. Allerdings muß diesen Gesichtspunkten und nicht den chemisch-physiologischen Eigenschaften der Hefen bei einer genauen Charakteristik derselben die Hauptrolle eingeräumt werden.

Diejenigen Eigenschaft einer Hefe, welche unter Umständen am leichtesten und raschesten typische Unterschiede gegenüber anderen Hefen erkennen lassen kann, ist ihr Verhalten gegen gewöhnliche Braunbierwürze. Durch die Arbeiten von P. Lindner[2]), M. Irmisch[3]), E. Prior[4]) u. a. wurde festgestellt, daß die Hefen bezüglich der Vergärung der Kohlehydrate der Bierwürze sich in zwei große Hauptgruppen, in die wenig zahlreichen niedrigvergärenden (Typus Saaz) und in die weitaus die Mehrzahl bildenden hochvergärenden (Typus Frohberg). Hierzu kommt dann noch als dritter Typus Hefe Logos mit höchster Vergärung.

Zur Bestimmung des Vergärungsgrades der drei obergärigen Hefen Rio, 25 und 170, d. h. der in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Extraktes ausgedrückten Menge von vergorenem Extrakt der Bierwürze wurden die drei Hefen, sowie als Vergleichshefen Reinkulturen der untergärigen Hefen Frohberg und Saaz mehrmals in 10-proz. Würze aufgefrischt. Von den letzten Kulturen wurde die vergorene Würze über den Bodensätzen bis auf einen geringen Rest abgegossen und letztere zu einer dickbreiigen Masse aufgeschüttelt. Von dieser wurde je 1 ccm in sterile, in größeren Erlenmeyer-Kolben befindliche Braunbierwürze (ca. 200 g mit 10 Proz. Extrakt) geimpft. Die Kolben wurden mit einem Schwefelsäuregärverschluß versehen und blieben bei Zimmertemperatur (18—20°) stehen.

Vorhergegangene vorläufige Bestimmungen des Vergärungsgrades der drei obergärigen Hefen hatten ergeben, daß Hefe 25 niedrigvergärend, Hefe 170 hochvergärend ist, während Hefe Rio sich bald dem einen, bald dem anderen Typus zuneigte. Als Grund für diese wechselnde Vergärung der Bierwürze muß die Eigentümlichkeit der Oberhefe Rio angenommen werden, sich frühzeitig in großen Flocken abzusetzen und einen festen Bodensatz zu bilden, wodurch die Gärtätigkeit der Hefezellen vorzeitig zur Ruhe kommt. Diese Eigenart gewisser Oberhefen

---

1) Bau, A., Der Sammelbegriff Saccharomyces cerevisiae. (Wochenschrift f. Brauerei. 1894. No. 43.)

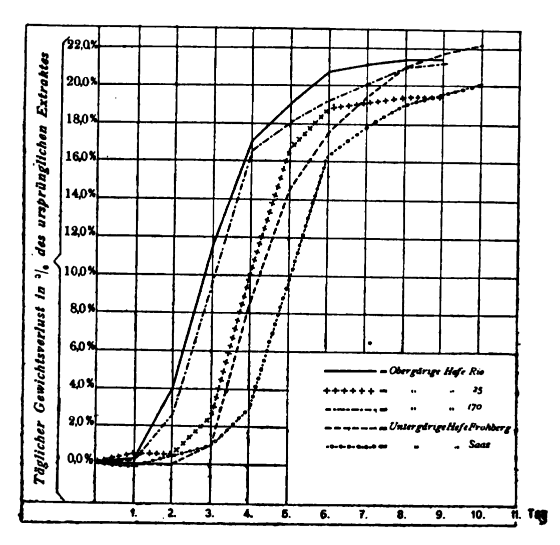
2) Lindner, P., Ueber einige Gärversuche mit verschiedenen Hefen. (Wochenschrift f. Brauerei. 1888. No. 14.)

3) Irmisch, M., Der Vergärungsgrad, zugleich Studien über zwei Hefecharaktere. (Wochenschrift f. Brauerei. 1891. p. 1135.)

4) Prior, E., Sind die Hefen Frohberg und Saaz der Berliner Brauereistation im physiologischen Sinn? (Bayrisches Brauerjournal. 1894. p. 518.)

wurde von F. Schönfeld[1]) auch unter praktischen Verhältnissen beobachtet, und auch P. Lindner[2]) scheint ähnliche Erfahrungen gemacht zu haben.

Infolge dieser Eigenart der Oberhefe Rio wurden während der ganzen Gärdauer die Kolben sehr oft aufgeschüttelt, um so sämtliche fünf Hefen zur vollen Gärleistung zu zwingen. Die drei Oberhefen, vor allem Rio und 170, zeigten bei der Gärung die für obergärige Hefen charakteristische Eigenschaft der starken Kohlensäureentwickelung und hefiger Schaumdecken, auch verlief die Gärung viel stürmischer als bei den untergärigen Hefen Frohberg und Saaz. Die sämtlichen Kolben wurden täglich gewogen, nachdem sie vorher durch kräftiges Schütteln möglichst von der Kohlensäure befreit worden waren. In folgender Zeichnung sind die durch die Gärung entstandenen Gewichtsverluste in den einzelnen Tagen in Kurven dargestellt. Da die Würze 10 Proz. Extrakt enthielt, ergab die Multiplikation der Gewichtsverluste für 100 g Würze mit 10 zugleich den entstandenen Verlust in Prozenten des ursprünglichen Gesamtextraktes. Die Zahlen sind Durchschnittsergebnisse aus zwei Parallelversuchen.



Aus den Kurven ist ersichtlich, daß die beiden obergärigen Bierhefen Rio und 170 am raschesten die Würze vergären, obgleich Oberhefe 25 in den ersten 24 Stunden einen gewissen Vorsprung zeigt. Dann folgt Oberhefe 25, die gegenüber den beiden vorhergehenden Hefen im allgemeinen stets um ca. 1 Tag in der Gärung zurück ist. Erst dann folgt die untergärige Hefe Frohberg; die Aehnlichkeit dieser Kurve mit der Gärkurve der Oberhefe Rio fällt sofort auf. Am langsamsten ist der Gärungsverlauf bei der untergärigen Hefe Saaz, deren Gärungskurve mit derjenigen der Oberhefe 25 eine gewisse Aehnlichkeit besitzt. Im allgemeinen zeigen die Gärversuche mit den obergärigen Hefen nach ca. 8 Tagen keine Gewichtsabnahme mehr, diejenigen der untergärigen Hefen lassen dagegen sogar noch am 10. Tage eine gewisse geringe Gewichtsabnahme erkennen. Nach 12 Tagen wurden die vergorenen Würzen analysiert, es ergaben sich hierbei folgende Resultate.

(Siehe Tabelle p. 56.)

Es gehört also, wie schon öfters bemerkt, die obergärige Hefe 25 dem im allgemeinen selteneren Typus der niedrigvergärenden Hefen an, die beiden obergärigen Hefen Rio und 170 sind hochvergärend (Typus Frohberg). Von den vier untergärigen Hefen Wills ist nur Stamm 7

---

1) Schönfeld, F., Reinzüchtung und Versand von obergärigen Brauereihefen. (Wochenschrift f. Brauerei. 1899. p. 153.)

2) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. 3. Auflage 1901. p. 203.

Bezeichnung der Hefe	Stammwürze Proz. Ball.	Extrakt Proz. Ball.		Alkohol	Vergärungsgrad	
		scheinbar	wirklich	Proz.	scheinbar Proz.	wirklich Proz.
Obergärige Hefe Rio	10,0	3,32	4,60	2,77	66,8	54,0
„ „ 25	10,0	4,50	5,55	2,30	55,0	44,5
„ „ 170	10,0	3,35	4,65	2,70	66,5	53,5
Untergärige „ Frohberg	10.0	3,32	4,65	2,75	66,8	53,5
„ „ Saaz	10,0	4,35	5,52	2,33	56,5	44,8

niedrigvergärend, dagegen die Stämme 2 und 93 hochvergärend; Stamm 6 nimmt eine mittlere Stellung ein.

Hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber den chemisch reinen Zuckerarten besteht nach den bisherigen Untersuchungen zwischen obergärigen und untergärigen Bierhefen ein markanter Unterschied: die letzteren vergären Raffinose (Melitriose) vollständig, die ersteren nur teilweise. Dieser zuerst von D. Loiseau[1]) und dann von A. Bau[2]) angegebene Unterschied soll darauf beruhen, daß den obergärigen Hefen ein Enzym, die Melibiase, fehlt, welches in den untergärigen Hefen vorhanden ist und die Melibiose in die direkt vergärbaren Komponenten Dextrose und Galaktose spaltet. Die Melitriose wird zwar bei beiden Hefegruppen durch das Invertin in Melibiose und Fruktose gespalten, welch letztere direkt vergoren wird. Die Melibiose dagegen wird nur von den untergärigen Hefen vergoren, von den obergärigen wird sie infolge des Mangels an Melibiase nicht zerlegt und infolgedessen auch nicht vergoren. Dieser Unterschied zwischen obergärigen und untergärigen Hefen, den A. Bau sehr eingehend studiert hat, erlitt zwar durch seine eigenen Untersuchungen[3])[4]), dann durch die Arbeiten von P. Lindner[5]) und J. Schukow[6]) eine gewisse Einschränkung in seiner fundamentalen Bedeutung; besonders den untergärigen Arten unter den Weinhefen, aber auch einigen wenigen untergärigen Bierhefen fehlt das Vermögen, Melitriose vollständig zu vergären, während andererseits einige obergärige Hefen bekannt sind, welche dieses Vermögen besitzen. Trotzdem erschien es durchaus angezeigt, die drei obergärigen Bierhefen Rio, 25 und 170 auf ihr Verhalten gegen Melitriose zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurden 3 g chemisch reiner Melitriose in 100 g Hefewasser gelöst; diese Lösung wurde in Portionen zu 10 ccm in Freudenreich-Kölbchen sterilisiert, die sterilen Kölbchen wurden mit je einer Platinöse frischer Hefe geimpft und 8 Tage bei 25° im Thermostaten der Gärung überlassen. Der nach der Sterilisation pyknometrisch bestimmte Extraktgehalt des Melitriosehefewassers war 3,32

1) Loiseau, D., Ueber die Vergärung der Raffinose durch verschiedene Hefearten. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1889. p. 483.)
2) Bau, A., Ueber das Verhalten der Oberhefe gegenüber Isomaltose und Raffinose. (Wochenschr. f. Brauerei. 1894. p. 113.)
3) Bau, A., Das Enzym Melibiase, sowie vergleichende Studien über Multase, Invertase und Zymase. (Wochenschrift f. Brauerei. 1903. p. 560.)
4) Bau, A., Beiträge zur Vergärbarkeit und analytischen Verwertung der Melitriose. (Wochenschr. f. Brauerei. 1898. p. 398.)
5) Lindner, B., Gärversuche mit verschiedenen Hefe- und Zuckerarten. (Wochenschrift f. Brauerei. 1900. p. 746.)
6) Schukow, J., Ueber reine Weinhefen. (Wochenschr. f. Brauerei. 1899. p. 195.)

Proz. Ball., so daß also 0,32 Proz. für den Extrakt des Hefewassers anzunehmen sind. Zur Prüfung kamen außer den drei obergärigen Hefen noch als Kontrollhefen die untergärigen Stämme Frohberg und Saaz.

Nach der Gärung wurde in jedem Kölbchen das spezifische Gewicht der vergorenen Nährlösung sowie die Kupfermenge bestimmt, welche durch 10 ccm der letzteren nach 2 Minuten langem Kochen aus 50 ccm Fehlingscher Lösung reduziert wurde. Aus dem durch das spezifische Gewicht gegebenen scheinbaren Extraktgehalt wurde der wirkliche nach der Ballingschen Formel berechnet. Der kleine Fehler, der sich naturgemäß bei der Berechnung ergibt, dürfte für den Zweck der vorliegenden Versuche wohl nicht in Betracht kommen. In folgender Tabelle sind die erhaltenen Resultate der Untersuchung zusammengestellt; die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus Parallelversuchen dar.

Bezeichnung der Hefe		Spez. Gewicht des Melitriose-hefewassers	Extrakt des Melitriose-hefewassers		Von der Meliotrose vergoren	Kupfer-reduktion
			scheinbar Proz. B.	wirklich Proz. B.	Proz.	Reduziertes Cu in g
	ohne Hefe	1,0133	—	3,32	—	—
Vergoren mit	Oberhefe Rio	1,0068	1,70	1,94	35,3	0,2640
	" 25	1,0072	1,80	2,04	32,0	0,2840
	" 170	1,0068	1,70	1,94	35,3	0,2670
	Untergär. Hefe Frohberg	0,9945	—	—	100,0	—
	" " Saaz	1,0002	0,05	—	fast 100,0	Spuren

Diese Versuche ergeben also, unter der Annahme, daß der 0,32 Proz. betragende Extrakt des Hefewassers vollständig verbraucht wurde, daß die drei obergärigen Bierhefen etwa nur ein Drittel des ursprünglichen Gehaltes an Melitriose vergoren hatten, dagegen hat die untergärige Hefe Frohberg die Melitriose ganz, die untergärige Hefe Saaz bis auf einige Spuren vergoren. Diese Resultate werden auch durch das Reduktionsvermögen der vergorenen Nährlösung gegenüber Fehlingscher Lösung bestätigt. Die erhaltenen Zahlen stimmen mit den von Bau angegebenen gut überein.

Es ist also im vorliegenden Falle das Verhalten der drei obergärigen Bierhefen gegen Melitriose tatsächlich ein sehr sicheres Unterscheidungsmerkmal gegenüber untergärigen Bierhefen. Zwischen den drei Oberhefen selbst sind die Unterschiede in der Vergärung von Melitriose sehr gering; bemerkenswert wäre höchsten, daß auch hier wieder Oberhefe 25 eine etwas schwächere Vergärung aufweist.

Es wäre gewiß sehr interessant gewesen, auch das Verhalten der drei obergärigen Bierhefen gegen andere Kohlehydrate u. s. w. zu prüfen. Ausgedehntere Untersuchungen zur Physiologie und Biologie der drei Hefen lagen jedoch zunächst nicht innerhalb des gesteckten Zieles; sie bleiben anderer Seite vorbehalten. Einer Reihe von Versuchen würde man von vornherein überhoben gewesen sein, da schon Will die drei Hefen zu den verschiedensten Untersuchungen benützt hat. So wurden sie bei den „Studien über Proteolyse durch Hefen“ [1]) eingehend hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, mit zahlreichen anderen

1) Will, H., Studien über die Proteolyse durch Hefen. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. 1898. p. 127 und 1901, p. 113.)

völlige Uebereinstimmung, lediglich das von Will bei seinen untergärigen Hefen nie beobachtete Auftreten von Dauerzellen innerhalb der Ströme der ausgewachsenen Riesenkolonieen deutet auf einen Unterschied zwischen obergärigen und untergärigen Bierhefen hinsichtlich des Aufbaues ihrer Riesenkolonieen hin.

Die Untersuchungen über das chemisch-physiologische Verhalten der drei obergärigen Hefen, besonders gegenüber den Kohlehydraten der Bierwürze (Vergärungsgrad) ergaben auch beträchtliche Verschiedenheiten zwischen den drei obergärigen Hefen. Das Verhalten gegen Melitriose, das bekannteste Mittel zur Differenzierung von obergäriger und untergäriger Bierhefe auf chemisch-physiologischem Wege. ließ auch im vorliegenden Fall einen prägnanten Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Hefegruppen erkennen.

Im allgemeinen kann aus den vorliegenden Untersuchungen wohl geschlossen werden, daß unter den obergärigen ebenso wie unter den untergärigen Bierhefen verschiedene Arten oder Rassen existieren, die durch morphologische und entwickelungsgeschichtliche Momente und nicht zuletzt auch durch bestimmte physiologische Eigenschaften in scharfem Gegensatz zueinander stehen.

Gegenüber den untergärigen Arten von Bierhefe, mit denen sie hinsichtlich ihrer Gesamtnatur fast vollständige Analogie aufweisen, sind sie lediglich durch größere Schnelligkeit und Intensität des Wachstums, der Sprossung, der Sporen- und Hautbildung ausgezeichnet, wenn auch in dem einen oder anderen dieser Punkte Abweichungen vorkommen können. Dazu kommen als weitere unterscheidende Kriterien der sparrige Wuchs der Sproßverbände, der sich auch in der Wachstumsform der Einzellkolonieen auf festem Nährsubstrat äußert, und endlich der wohl in den allermeisten Fällen zu konstatierende Mangel an dem Melibiose spaltenden Enzym Melibiase bei den obergärigen Bierhefen.

Erklärung der Tafeln.

Links oben: Oberhefe 25. Mitte unten: Oberhefe Rio. Rechts oben: Oberhefe 170.

Tafel I.

Fig. 1. Riesenkolonieen der drei Hefen bei 20° nach 48 Stunden
Fig. 2. „ „ „ „ „ 10—12° „ 4 Tagen
Fig. 3. „ „ „ „ „ 20° „ 4 „

Sämtliche auf 10-proz. Würzegelatine.

Fig. 4. Riesenkolonieen der drei Hefen bei 10—12° nach 8 Tagen auf 16-proz. Würzegelatine.

Sämtliche Figuren in natürlicher Größe.

Tafel II.

Fig. 1. Riesenkolonieen der drei Hefen nach 15 Tagen
Fig. 2. „ „ „ „ „ ca. 2 Monaten

Tafel III.

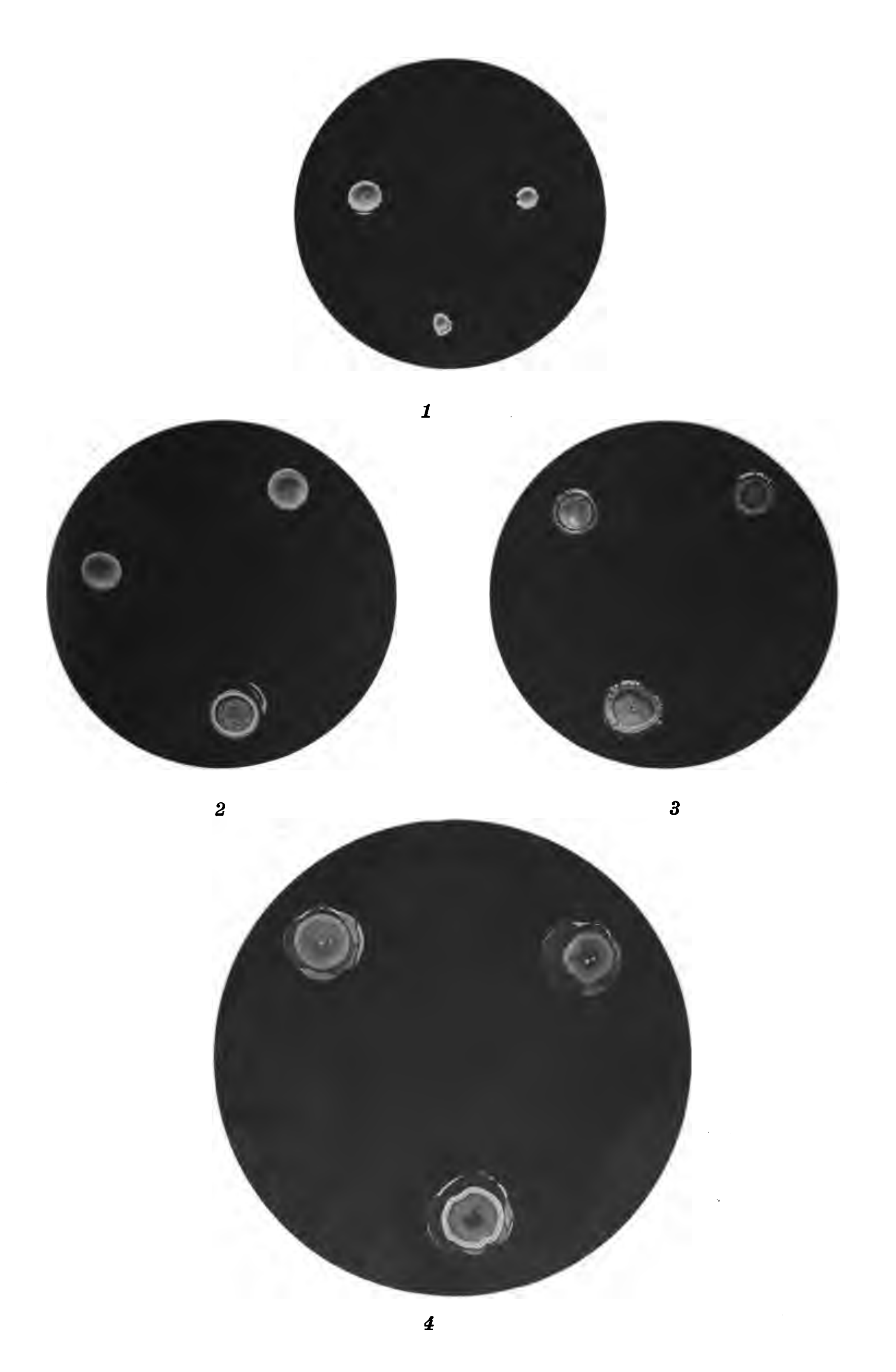
Fig. 1. Riesenkolonieen der drei Hefen nach ca. 5 Monaten.

Sämtliche auf 10-proz. Würzegelatine.

Fig. 2. Rhizoiden der Riesenkolonieen der drei Hefen nach 2—3 Wochen.

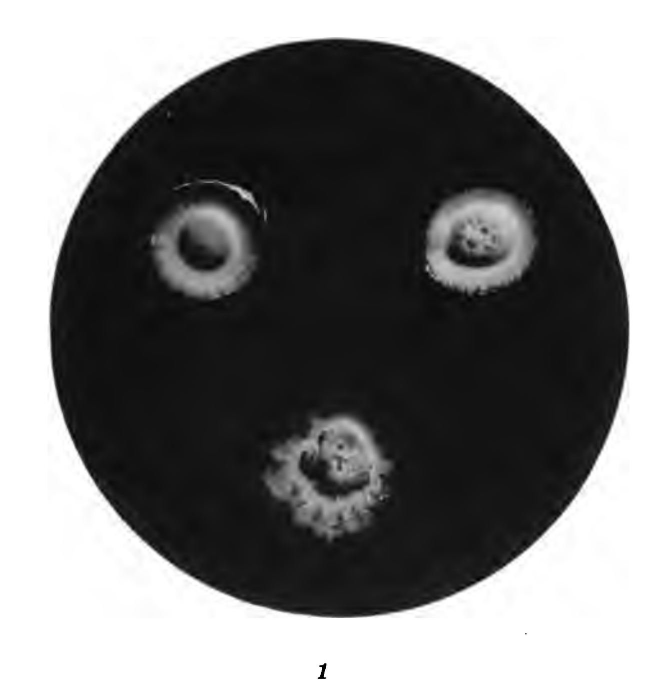
Sämtliche Figuren in ca. $1^1/_2$-facher Vergrößerung.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 3049



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Crayondruck von J. B. Obernetter, München.



1



2

Verlag von Gustav Fischer in Jena.
Crayondruck von J. B. Obernetter, München



Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena





